

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/022739 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/06, C07K 16/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011318

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
PCT/JP02/08999 2002 年 9 月 4 日 (04.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間五丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒153-8904 東京都 目黒区 駒場 4-6-1 東京大学先端科学技術研究センター内 Tokyo (JP). 緑川 泰 (MIDORIKAWA, Yutaka) [JP/JP]; 〒153-8904 東京都 目黒区 駒場 4-6-1 東京大学先端科学技術研究センター内 Tokyo (JP). 中野 清孝 (NAKANO, Kiyotaka) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門一丁目 135 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 大泉 巖雄 (OHIZUMI, Iwao) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門一丁目 135 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 伊藤 行夫 (ITO, Yukio) [JP/JP]; 〒151-0064 東京都 渋谷区 上原

2-47-19 株式会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP). 時田 進 (TOKITA, Susumu) [JP/JP]; 〒151-0064 東京都 渋谷区 上原 2-47-19 株式会社ペルセウスプロテオミクス内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY AGAINST N-TERMINAL PEPTIDE OR C-TERMINAL PEPTIDE OF GPC3 SOLUBILIZED IN BLOOD

(54) 発明の名称: GPC3 の血中可溶性 N 端ペプチドまたは C 端ペプチドに対する抗体

(57) Abstract: An antibody against solubilized glypican 3 (GPC3) whereby solubilized GPC3 in a subject sample can be detected. By detecting solubilized GPC3 in a subject sample *in vitro*, it can be judged whether or not the subject suffers from cancer, in particular, liver cancer. Further, a cell-disrupting agent or an anticancer agent containing this antibody against GPC which can disrupt cells, in particular, cancer cells.

(57) 要約: 被検試料中の可溶性グリピカン 3 (GPC3) を検出することができる、可溶性 GPC3 に対する抗体である。被検試料中の可溶性 GPC3 を *in vitro* で検出することにより被検体が癌、特に肝臓癌に罹患しているか否かを診断することができる。さらに、細胞、特に癌細胞を破壊することができる GPC に対する抗体であり、該抗体を含む細胞破壊剤または抗癌剤である。



WO 2004/022739 A1

明細書

GPC3の血中可溶化N端ペプチドまたはC端ペプチドに対する抗体

技術分野

本発明はGPC3のN端ペプチドまたはC端ペプチドに対する抗体に関する。具体的には、可溶型GPC3コアタンパク質に見られる約40kDaのGPC3N端ペプチドに対する抗体に関する。また、可溶型GPC3コアタンパク質に見られる約30kDaのGPC3C端ペプチドに対する抗体に関する。

背景技術

細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンの新しいファミリーとしてグリピカンファミリーの存在が報告されている。現在までのところ、グリピカンファミリーのメンバーとして、5種類のグリピカン（グリピカン1、グリピカン2、グリピカン3、グリピカン4およびグリピカン5）が存在することが報告されている。このファミリーのメンバーは、均一なサイズ（約60kDa）のコアタンパク質を持ち、特異的でよく保持されたシステインの配列を共有しており、グリコシルフォスファチジルイノシトール（GPI）アンカーにより細胞膜に結合している。

グリピカン3（GPC3）は、発生における細胞分裂やそのパターンの制御に深く関わっていることが知られている。又、GPC3遺伝子が肝癌細胞において高発現しており、GPC3遺伝子が肝細胞癌マーカーとして利用できる可能性があることが知られている。

以前、本発明者らは抗GPC3抗体がADCC活性及びCDC活性を有しており肝癌の治療に有用であることを見出し、特許出願を行った（特願2001-189443）。

しかしながら、GPC3は膜結合タンパク質であり分泌型のPGC3タンパク質が存在することは報告されておらず、GPC3タンパク質自体を血中の癌マーカーとして用いることは検討されていなかった。

発明の開示

本発明者らは、グリピカン 3 (GPC3) が358番目のアミノ酸部位、若しくは374番目のアミノ酸部位、若しくはそれらの近傍領域で切断される事実を見出し、可溶型GPC3が肝癌患者の血中に分泌されるという仮説を立て、GPC3サンドイッチELISA系を確立し、GPC3高発現であるヒト肝癌細胞HepG2の培養上清中に分泌型GPC3の存在を明らかにした。さらに、HepG2を移植したマウス血漿中のみならずヒト肝癌患者血清中の可溶型GPC3測定にも成功した。GPC3は肝癌マーカーであるAFPよりも早期の肝癌で遺伝子発現が認められるので、GPC3の検出は癌の診断として有用であると考えられた。また可溶型GPC3はC末端ペプチド断片側を認識する抗GPC3抗体では検出しにくい傾向にあることから、分泌型GPC3はN端ペプチド断片優位と推定された。従って、分泌型GPC3の検出には、N端を認識する抗GPC3抗体を用いるのが好ましいと考え、GPC3のN端ペプチドを認識する抗体を開発することを試み、本発明を完成させるに至った。さらに、GPC3のC末端に対する抗体が高い細胞傷害活性を有することを見出し、癌細胞の破壊、すなわち癌の治療には、C末端を認識する抗GPC3抗体を用いるのが好ましいと考え、GPC3のC端ペプチドを認識する抗体を開発することを試み、本発明を完成させるに至った。

GPC3は肝癌細胞株以外に、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫などの癌細胞株においても発現が確認されているので、肝癌以外の診断にも適用できる可能性がある。

すなわち、本発明はGPC3のN端ペプチドに対する抗体である。

また、本発明はGPC3のN端ペプチドが血中可溶化ペプチドである前記抗体である。

さらに、GPC3のN端ペプチドがGPC3の第1番目のアミノ酸から第374番目のアミノ酸からなるペプチド又は第1番目のアミノ酸から第358番目のアミノ酸からなるペプチドである前記抗体である。

さらに、本発明はモノクローナル抗体である前記抗体である。

さらに、本発明は不溶性支持体に固定されていることを特徴とする前記抗体である。

さらに、本発明は標識物質で標識されていることを特徴とする前記抗体である。

さらにまた、本発明はGPC3のC端ペプチドに対する抗体である。

さらに、GPC3のC端ペプチドがGPC3の第359番目のアミノ酸から第580番目のアミノ酸からなるペプチド又は第375番目のアミノ酸から第580番目のアミノ酸からなるペプチドである前記抗体である。

さらに、本発明はモノクローナル抗体である上記抗体である。

さらに、本発明はキメラ抗体である上記抗体である。

さらに、本発明は細胞傷害抗体である上記抗体である。

さらに、本発明は上記の抗体を含む細胞破壊剤である。

さらに、本発明は細胞が癌細胞である上記細胞破壊剤である。

さらに、本発明は上記の抗体を含む抗癌剤である。

さらに、本発明は上記の抗体を細胞と接触させることを含む、細胞傷害を引き起こす方法である。

さらに、本発明は細胞が癌細胞である上記方法である。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明は、被検試料中の可溶化グリピカン3 (GPC3)を検出することができる可溶化GPC3に対する抗体である。被検試料中の可溶化GPC3をin vitro で検出することにより被検体が癌、特に肝臓癌に罹患しているか否かを診断することができる。

検出とは、定量的又は非定量的な検出を含み、例えば、非定量的な検出としては、単にGPC3タンパク質が存在するか否かの測定、GPC3タンパク質が一定の量以上存在するか否かの測定、GPC3タンパク質の量を他の試料（例えば、コントロール試料など）と比較する測定などを挙げることができ、定量的な検出としては、GPC3タンパク質の濃度の測定、GPC3タンパク質の量の測定などを挙げることができる。

被検試料とは、GPC3タンパク質が含まれる可能性のある試料であれば特に制限されないが、哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましく、さらに好ましくはヒトから採取された試料である。被検試料の具体的な例としては、例えば、血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾

液、尿などを挙げるができるが、好ましいのは血液、血清、血漿である。又、生物の体から採取された細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

本発明のGPC3のN端ペプチドに対する抗体を用いて診断される癌は、特に制限されず、具体的には、肝癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫などを挙げるができるが、好ましいのは肝癌である。

また、本発明のGPC3のC端ペプチドに対する抗体は、高い細胞傷害活性を有するので、癌細胞の破壊、すなわち癌の治療に用いることができる。該抗体を用いて治療し得る癌は、特に制限されず、具体的には、肝癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫などを挙げるができるが、好ましいのは肝癌である。

1. 抗GPC3N端ペプチド抗体または抗GPC3のC端ペプチド抗体の作製

GPC3のアミノ酸配列及び塩基配列はLage, H. et al., Gene 188 (1997), 151-156、又はGenBank: Z37987を用いることができる。

本発明で用いられる抗GPC3 N端ペプチド抗体および抗GPC3のC端ペプチド抗体はそれぞれGPC3タンパク質のN端ペプチドおよびGPC3タンパク質のC端ペプチドに特異的に結合すればよく、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。具体的には、マウス抗体、ラット抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体などの公知の抗体を用いることができる。

GPC3が切断点において切断された場合、約40kDaのペプチドと約30kDaのペプチドとなり、N端側が約40kDa、C端側が約30kDaとなる。GPC3切断点は358番目のアミノ酸部位、若しくは374番目のアミノ酸部位、若しくはそれらの近傍領域で切断される。主な切断点は358番目のアミノ酸部位であると考えられる。

GPC3のN端ペプチドは、可溶型GPC3コアタンパク質に見られる約40kDaのGPC3 N端ペプチドである。上記切断点から、N端ペプチドは好ましくはアミノ酸1番目のMetからアミノ酸374番目のLysまでのアミノ酸配列からなるペプチドまたはアミノ酸1番目のMetからアミノ酸358番目のArgまでのアミノ酸配列からなるペプチドであり、さらに、主な切断点が358番目のアミノ酸部位と予測されること

から、より好ましくはアミノ酸1番目のMetからアミノ酸358番目のArgまでのアミノ酸配列からなるペプチドである。また本発明においては、それらN端ペプチドの断片でもよい。本明細書においてN端ペプチドは、N端断片、N端ペプチド断片ともいう。

すなわち、本発明のGPC3のN端ペプチドに対する抗体は、GPC3タンパク質のN端ペプチドに存在するエピトープを認識する抗体であり、その認識するエピトープの部位は限定されない。

GPC3のC端ペプチドは、可溶型GPC3コアタンパク質に見られる約30kDaのGPC3 C端ペプチドである。上記切断点から、C端ペプチドは好ましくはアミノ酸359番目のSerからアミノ酸580番目のHisまでのアミノ酸配列からなるペプチドまたは375番目のValからアミノ酸番号580番目のHisまでのアミノ酸配列からなるペプチドであり、さらに、主な切断点が358番目のアミノ酸部位と予測されることから、より好ましくはアミノ酸359番目のSerからアミノ酸580番目のHisまでのアミノ酸配列からなるペプチドである。また本発明においては、それらC端ペプチドの断片でもよい。本明細書においてC端ペプチドは、C端断片、C端ペプチド断片ともいう。

すなわち、本発明のGPC3のC端ペプチドに対する抗体は、GPC3タンパク質のC端ペプチドに存在するエピトープを認識する抗体であり、その認識するエピトープの部位は限定されない。

抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。

さらに、本発明で使用する抗GPC3N端ペプチド抗体または抗GPC3C端ペプチド抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用する抗GPC3抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以

下のようにして作製できる。すなわち、GPC3を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるGPC3を、Lage, H. et al., Gene 188 (1997), 151-156に開示されたGPC3 (MXR 7) 遺伝子／アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、GPC3をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトGPC3タンパク質を公知の方法で精製する。

また、天然のGPC3を精製して用いることもできる。

次に、この精製GPC3タンパク質を感作抗原として用いる。GPC3タンパク質の全体を感作抗原として用いてもよく、この場合はGPC3タンパク質のN端ペプチドに対する抗体もC端ペプチドに対する抗体も誘起されるので、その中からGPC3タンパク質のN端ペプチドに対する抗体およびC端ペプチドに対する抗体を別々に選択すればよい。あるいは、GPC3のN端側の部分ペプチドまたはGPC3のC端側の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトGPC3のアミノ酸配列より化学合成により得ることもできるし、GPC遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで得ることもでき、さらに天然のGPC3をタンパク質分解酵素により分解することによっても得ることができる。部分ペプチドとして用いるGPC3の部分はGPC3のN端ペプチドであり、この部分のエピトープを含むより小さいペプチド断片を用いることもできる。さらに、部分ペプチドとしてGPC3のC端ペプチドを用いればよいし、この部分のエピトープを含むより小さいペプチド断片を用いることもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4~21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。特に分子量の小さい部分ペプチドを感作抗原として用いる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合させて免疫することが望ましい。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler. G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler. G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高

めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。
免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液（例えば平均分子量1000～6000程度）を通常30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の実験希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングを行う。

目的とする抗体のスクリーニングおよび単クローニングは、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法で行えばよい。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイタープレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させ、担体を洗浄した後に酵素標識第2次抗体等を反応させることにより、培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれるかどうか決定できる。目的とする抗体を産生するハイブリドーマを実験希釈法等によりクローニングすることができる。この際、抗原としては、GPC3のN端ペプチドもしくはその断片またはGPC3のC端ペプチドもしくはその断片をスクリーニング用抗原として用いればよい。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでGPC3に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、GPC3N端ペプチドまたはGPC3C端ペプチドへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるGPC3を投与して抗GPC3N端ペプチド抗体産生細胞または抗GPC3C端ペプチド抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からGPC3N端ペプチドに対するヒト抗体またはGPC3C端ペプチドに対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号W0 94/25585 号公報、W0 93/12227 号公報、W0 92/03918 号公報、W0 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。具体的には、抗GPC3N端ペプチド抗体を産生するハイブリドーマまたは抗GPC3C端ペプチド抗体を産生するハイブリドーマから、抗GPC3N端ペプチド抗体または抗GPC3C端ペプチド抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により行って全RNAを調製し、mRNA

Purification Kit (Pharmacia製) 等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia製) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。

目的とする抗GPC3 N端ペプチド抗体または抗GPC3 C端ペプチド抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C領域) をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗GPC3 N端ペプチド抗体または抗GPC3 C端ペプチド抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖 (H鎖) または軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生されるタンパク質 (ヤギ β カゼインなど) をコードする遺伝子の途中に挿入して融

合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

本発明では、上記抗体のほかに、人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体（ヒト化 (Humanized) 抗体、など）を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。本発明の抗体を治療用抗体として使用する場合には、遺伝子組換え型抗体を用いることが好ましい。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により合成する (W098/13388号公報に記載の方法を参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer

Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、可変領域にヒト以外の哺乳動物由来抗体の配列を含み、定常領域にヒト抗体由来の配列を含むことが好ましい。

ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト化抗体などのキメラ抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明で使用される抗体は、抗体の全体分子に限られず、GPC3N端ペプチドまたはGPC3C端ペプチドに結合する限り、抗体の断片又はその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、. Academic Press, Inc.、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリリンカーを介して連結される(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

(1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、標識物質、トキシン、放射性物質等の各種分子と結合した抗グリピカン抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

さらに、本発明で使用する抗体は、二重特異性抗体 (bispecific antibody) であってもよい。二重特異性抗体はGPC3N端ペプチドまたはGPC3C端ペプチド上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位がGPC3N端ペプチドまたはGPC3C端ペプチドを認識し、他方の抗原結合部位が標識物質等を認識してもよい。二重特異性抗体は2種類の抗体のHL対を結合させて作製することもできるし、異なるモノク

ローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

さらに、本発明においては、細胞傷害活性を増強する目的などで、糖鎖を改変した抗体などを用いることも可能である。抗体の糖鎖改変技術は既に知られている（例えば、WO00/61739、WO02/31140など）。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40（SV40）等のウイルスプロモーター／エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1a（HEF1a）などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。

SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法（Nature（1979）277, 108）により、また、HEF1aプロモーター／エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法（Nucleic Acids Res.（1990）18, 5322）により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法（Nature（1998）341, 544-546；FASEB J.（1992）6, 2422-2427）により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法（Science（1988）240, 1041-1043）により発現することができる。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用する抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用する抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A

Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

2. GPC3の検出

本発明のGPC3N端側ペプチドに対する抗体を用いて、被検試料中のGPC3を検出することができる。

本発明の抗体を用いて検出するGPC3は、特に限定されず、全長GPC3でも、その断片でもよい。GPC3断片を検出する場合には、N端ペプチド断片を検出することが好ましい。

被検試料に含まれるGPC3タンパク質の検出方法は特に限定されないが、本発明の抗GPC3N端ペプチド抗体を用いた免疫学的方法により検出することが好ましい。免疫学的方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウエスタンブロット、免疫染色、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのは酵素結合免疫吸着定量法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) (例えば、sandwich ELISA) である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

抗GPC3N端ペプチド抗体を用いた一般的な検出方法としては、例えば、抗GPC3N端ペプチド抗体を支持体に固定し、ここに被検試料を加え、インキュベートを行い抗GPC3N端ペプチド抗体とGPC3タンパク質を結合させた後に洗浄して、抗GPC3N端ペプチド抗体を介して支持体に結合したGPC3タンパク質を検出することにより、被検試料中のGPC3タンパク質の検出を行う方法を挙げることができる。

本発明において用いられる支持体としては、例えば、アガロース、セルロースなどの不溶性の多糖類、シリコン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ナイロン樹脂、ポリカーボネイト樹脂などの合成樹脂や、ガラスなどの不溶性の支持体を挙げることができる。これらの支持体は、ビーズやプレートの形状で用いることが可能である。ビーズの場合、これらが充填されたカラムなどを

用いることができる。プレートの場合、マルチウェルプレート（96穴マルチウェルプレート等）、やバイオセンサーチップなどを用いることができる。抗GPC3N端ペプチド抗体と支持体との結合は、化学結合や物理的な吸着などの通常用いられる方法により結合することができる。これらの支持体はすべて市販のものを用いることができる。

抗GPC3N端ペプチド抗体とGPC3タンパク質との結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液、などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、GPC3タンパク質と抗GPC3抗体の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、Tween20等の界面活性剤を含む緩衝液などが使用される。

本発明のGPC3タンパク質検出方法においては、GPC3タンパク質を検出したい被検試料の他に、コントロール試料を設置してもよい。コントロール試料としては、GPC3タンパク質を含まない陰性コントロール試料やGPC3タンパク質を含む陽性コントロール試料などがある。この場合、GPC3タンパク質を含まない陰性コントロール試料で得られた結果、GPC3タンパク質を含む陽性コントロール試料で得られた結果と比較することにより、被検試料中のGPC3タンパク質を検出することが可能である。また、濃度を段階的に変化させた一連のコントロール試料を調製し、各コントロール試料に対する検出結果を数値として得て、標準曲線を作成し、被検試料の数値から標準曲線に基づいて、被検試料に含まれるGPC3タンパク質を定量的に検出することも可能である。

抗GPC3N端ペプチド抗体を介して支持体に結合したGPC3タンパク質の検出の好ましい態様として、標識物質で標識された抗GPC3 N端ペプチド抗体を用いる方法を挙げることができる。

例えば、支持体に固定された抗GPC3抗体に被検試料を接触させ、洗浄後に、GPC3タンパク質を特異的に認識する標識抗体を用いて検出する。

この際、支持体に固定される抗GPC3N端ペプチド抗体と標識物質で標識される

抗GPC3N端ペプチドC抗体はGPC3分子の同じエピトープを認識してもよいが、異なるエピトープを認識することが好ましい。

抗GPC3N端ペプチド抗体の標識は通常知られている方法により行うことが可能である。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ (^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I など)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ビオチンなどを挙げることができる。標識物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンをさらに添加することが好ましい。標識物質と抗GPC3抗体との結合には、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法を用いることができる。

具体的には、抗GPC3N端ペプチド抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗GPC3N端ペプチド抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、標識抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、プレートに残った標識抗GPC3抗体を検出する。検出は当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションやRIA法により検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。基質の具体的な例としては、2, 2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ジアンモニウム塩 (ABTS)、1, 2'-フェニレンジアミン (オルソ-フェニレンジアミン)、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TME)などを挙げることができる。蛍光物質の場合には蛍光光度計により検出することができる。

本発明のGPC3タンパク質検出方法の特に好ましい態様として、ビオチンで標識された抗GPC3N端ペプチド抗体及びアビジンを用いる方法を挙げることができる。

具体的には、抗GPC3 N端ペプチド抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗GPC3N端ペプチド抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、ビオチン標識抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素と結合したアビジンを加える。インキュベーション後、プレートを洗浄し、アビジンに結合している酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標にGPC3タンパク質を検出する。

本発明のGPC3タンパク質検出方法の他の態様として、GPC3タンパク質を特異的に認識する一次抗体、及び該一次抗体を特異的に認識する二次抗体を用いる方法を挙げることができる。

例えば、支持体に固定された抗GPC3 N端ペプチド抗体に被検試料を接触させ、インキュベーションした後、洗浄し、洗浄後に結合しているGPC3タンパク質を、一次抗GPC3抗体及び該一次抗体を特異的に認識する二次抗体により検出する。この場合、二次抗体は好ましくは標識物質により標識されている。

具体的には、抗GPC3N端ペプチド抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗GPC3N端ペプチド抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベートの後、洗浄し、一次抗GPC3抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に認識する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、プレートに残った二次抗体を検出する。二次抗体の検出は前述の方法により行うことができる。

本発明のGPC3タンパク質の検出方法の他の態様としては、凝集反応を利用した検出方法を挙げることができる。該方法においては、抗GPC3N端ペプチド抗体を感作した担体を用いてGPC3を検出することができる。抗体を感作する担体として

は、不溶性で、非特異的な反応を起こさず、かつ安定である限り、いかなる担体を使用してもよい。例えば、ラテックス粒子、ベントナイト、コロジオン、カオリン、固定羊赤血球等を使用することができるが、ラテックス粒子を使用するのが好ましい。ラテックス粒子としては、例えば、ポリスチレンラテックス粒子、スチレン-ブタジエン共重合体ラテックス粒子、ポリビニルトルエンラテックス粒子等を使用することができるが、ポリスチレンラテックス粒子を使用するのが好ましい。感作した粒子を試料を混合し、一定時間攪拌した後に、試料中にGPC3抗体が高濃度で含まれるほど粒子の凝集度が大きくなるので、凝集を肉眼でみることによりGPC3を検出することができる。また、凝集による濁度を分光光度計等により測定することによっても検出することが可能である。

本発明のGPC3タンパク質の検出方法の他の態様としては、例えば、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いた方法を挙げることができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーはタンパク質-タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である。例えば、BIAcore (Pharmacia製) 等のバイオセンサーを用いることによりGPC3タンパク質と抗GPC3N端ペプチド抗体の結合を検出することが可能である。具体的には、抗GPC3N端ペプチド抗体を固定化したセンサーチップに、被検試料を接触させ、抗GPC3N端ペプチド抗体に結合するGPC3タンパク質を共鳴シグナルの変化として検出することができる。

本発明の検出方法は、種々の自動検査装置を用いて自動化することもでき、一度に大量の試料について検査を行うことも可能である。

本発明は、癌の診断のための被検試料中のGPC3タンパク質を検出するための診断薬またはキットの提供をも目的とするが、該診断薬またはキットは少なくとも抗GPC3N端ペプチド抗体を含む。該診断薬またはキットがEIA法に基づく場合は、抗体を固相化する担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。該診断薬またはキットがラテックス等の担体を用いた凝集法に基づく場合は抗体が吸着した担体を含んでいてもよい。また、該キットは、適宜、プロ

ッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでもよい。

3. 抗GPC3 C端ペプチド抗体を用いた癌細胞の破壊および癌の治療

(1) 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガンドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

本発明で使用される抗GPC3 C端ペプチド抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、GPC3 C端ペプチドをコーティングしたプレートに、抗GPC3 C端ペプチド抗体を含む試料、例えば、抗GPC3 C端ペプチド抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用される抗体の活性を確認するには、抗GPC3 C端ペプチド抗体の中和活性を測定する。

(2) 細胞傷害活性

治療目的の場合、本発明に使用する抗体は、細胞傷害活性として、ADCC活性またはCDC活性を有することが好ましい。

ADCC活性は、エフェクター細胞と標的細胞と抗GPC3 C端ペプチド抗体を混合し、ADCCの程度を調べることにより測定することができる。エフェクター細胞として例えば、マウス脾細胞やヒト末梢血や骨髓から分離した単核球等を利用することができ、標的細胞として

はヒト肝細胞株HuH-7等のヒト株化細胞を用いることができる。標的細胞をあらかじめ ^{51}Cr により標識し、これに抗GPC3 C端ペプチド抗体を加えインキュベーションを行い、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベーションを行う。インキュベーション後上清を採取し、上清中の放射活性をカウントすることによりADCC活性を測定することができる。

また、CDC活性は、上述の標識標的細胞と抗GPC3 C端ペプチド抗体を混合し、その後補体を添加してインキュベーションを行い、培養後に上清中の放射活性をカウントすることにより測定することができる。

抗体が細胞傷害活性を発揮するには、Fc部分が必要であるので、本発明の細胞増殖阻害剤が、抗体の細胞傷害活性を利用したものである場合には、本発明に使用する抗GPC3 C端ペプチド抗体はFc部分を含んでいることが好ましい。

(3) 細胞の破壊

本発明の抗GPC3 C端ペプチド抗体を細胞破壊、特に癌細胞の破壊に用いることもできる。さらに本発明の抗GPC3 C端ペプチド抗体を抗癌剤として用いることもできる。本発明の抗体により治療・予防させる癌は特に限定されず、肝癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫などに用いることができるが、肝癌が好ましい。

(4) 投与方法および製剤

本発明の細胞破壊剤または抗癌剤は、細胞の異常増殖に基づく疾患、特に癌に対する治療又は改善を目的として使用される。

有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.001mg から1000mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01~100000mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗GPC3 C端ペプチド抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、本発明の治療剤の投与時期としては、疾患の臨床症状が生

ずる前後を問わず投与することができる。

本発明の抗本発明の抗GPC3 C端ペプチド抗体を抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ（Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、もちろんこれらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗本発明の抗GPC3 C端ペプチド抗体を抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、Gene Chip を用いたGPC3mRNAの発現解析の結果を示す図であり、図1AはGPC3の発現を、図1Bはアルファフェトプロテイン（AFP）の発現を示す。横軸のNL、CH、LC、WD、MDおよびPDはそれぞれ正常肝臓、肝炎症部位、肝硬変部位、高分化癌、中分化癌および低分化癌を示す。

図2は、精製ヘパラン硫酸付加型のGPC3及びGPC3コアタンパク質のCBB染色像を示す図である。

図3は、ヒト肝臓癌におけるGPC3遺伝子の発現を示す図である。

図4は、抗GPC3抗体を用いて行った可溶型コアタンパク質のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

図5は、抗GPC3抗体を用いたサンドイッチELISAの原理を示す図である。

図6は、M6B1およびM18D4を用いたGPC3サンドイッチELISAのスタンダードカーブを示す図である。

図7は、GPC3の構造を示す模式図である。

図8は、ELISAにおける抗GPC3抗体の組み合わせを示す図である。

図9は、様々な組み合わせの抗GPC3抗体を用いたGPC3サンドイッチELISA系のスタンダードカーブを示す図である。

図10は、抗GPC3 C末端ペプチド抗体のADCC活性測定の結果を示す図である。

図11は、抗GPC3 C末端ペプチド抗体のCDC活性測定の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本願明細書記載の実施例において、以下の材料を用いた。

可溶型GPC3、可溶型GPC3コアタンパク質の発現ベクターとして、pCAGGSにDHFR遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだpCXND2、pCXND3を用いた。

DXB11はATCCより購入した細胞を用い、培養には5%FBS (GIBCO BRL CAT# 10099-141, LOT# A0275242) / Minimum Essential Medium Alpha medium (α MEM(+)) (GIBCO BRL CAT# 12571-071) / 1% Penicillin- Streptomycin (GIBCO BRL CAT#

15140-122) を用いた。DXB11を用いた発現株の選抜には、500 μ g/mL Geneticin (GIBCO BRL CAT# 10131-027) / 5% FBS / α MEM without ribonucleosides and deoxyribonucleosides (GIBCO BRL CAT# 12561-056) (α MEM (-)) / PSあるいは同培地に終濃度25nMとなるようにMTXを加えたものを用いた。

HepG2はATCCより購入した細胞を用い、10% FBS / ダルベッコの改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (GIBCO BRL CAT# 11995-065) / PSで培養を行った。

ハイブリドーマは10%FBS / RPMI1640 / 1 x HAT media supplement (SIGMA CAT# H-0262) / 0.5 x BM-Condimed H1 Hybridoma cloning supplement (Roche CAT# 1088947) で培養した。

実施例1 ヒトGPC3 (GPC3) cDNAのクローニングおよび発現解析

ヒトグリピカン3 (以下GPC3) をコードする全長cDNAのクローニング

ヒトGPC3をコードする全長cDNAは、大腸癌細胞株Caco2より常法により調製した1st strand cDNAを鋳型とし、Advantage2 kit (CLONTECH社 Cat. No. 8430-1) を用いたPCR反応により増幅した。すなわち、2 μ lのCaco2由来cDNA、1 μ lのセンスプライマー (配列番号1)、1 μ lのアンチセンスプライマー (配列番号2)、5 μ lのAdvantage2 10xPCR buffer、8 μ lのdNTP mix (1.25 mM)、1.0 μ lのAdvantage polymerase Mixを含む50 μ lの反応液を、94 $^{\circ}$ Cで1分、63 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで3分からなるサイクルを35回行った。PCR反応による増幅産物は (pGEM-T Easy Vector System I (Promega社Cat. No. A1360) を用いてTAベクターpGEM-T easyに挿入した) ABI3100 DNAシーケンサーを用い配列の確認を行った結果、ヒトGPC3の全長をコードするcDNAを単離した。配列番号3で表される配列はヒトGPC3遺伝子の塩基配列を、配列番号4で表される配列はヒトGPC3タンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号1 : GATATC-ATGGCCGGGACCGTGCGCACC GCGT

配列番号2 : GCTAGC-TCAGTGCACCAGGAAGAAGAAGCAC

GeneChipを用いたヒトGPC3 mRNA発現解析

24例の肝臓癌腫瘍部（高分化癌:WD、中分化癌:MD、低分化癌:PD）、16例の肝臓癌非癌部（肝炎部位:CH、肝硬変部位:LC）、8例の正常肝臓:NL（インフォームドコンセント取得済み、東京大学医学部及び埼玉癌センターにおいて入手）におけるmRNA発現解析をGeneChip™ UG-95A Target（Affymetrix社）を用いて行った。すなわち、上記各組織よりISOGEN（日本ジーン社）を用いてトータルRNAを調製した後、それぞれ15 μ gのtotal RNAを使用し、Expression Analysis Technical Manual（Affymetrix社）に準じて遺伝子発現解析を行った。

その結果、図1に示すようにヒトGPC3遺伝子（Probe Set ID: 39350_at）は肝臓癌の分化の程度に関わらず多くの症例においてmRNAの発現量が正常肝組織に比べ明らかに高いことが確認された。さらに、現在最もよく肝臓癌の診断マーカーとして使用されているアルファフェトプロテイン（Probe Set ID: 40114_at）のmRNA発現と比較した結果、アルファフェトプロテインのmRNA発現がほとんどみられない高分化癌においてもGPC3は十分なmRNAの発現の亢進が認められ、かつmRNA発現亢進している割合がGPC3において高いことが明らかとなった。以上のことから、GPC3の検出は肝臓癌の早期診断法として有用と考えられる。

実施例2 抗GPC3抗体の作製

可溶型ヒトGPC3の作製

抗GPC3抗体作製のための材料として、C末端側の疎水性領域を欠損させた可溶型GPC3タンパク質を作製した。

東大先端研より供与された完全長ヒトGPC3 cDNAを含むプラスミドDNAを用い、可溶型GPC3 cDNA発現プラスミドDNAを構築した。C末端側の疎水領域（564-580 アミノ酸）を除くように設計した下流プライマー（5'- ATA GAA TTC CAC CAT GGC CGG GAC CGT GCG C -3'（配列番号5））とEcoRI認識配列、Kozak配列を加えた上流プライマー（5'- ATA GGA TCC CTT CAG CGG GGA ATG AAC GTT C -3'（配列番号6））を用いてPCRを行った。得られたPCR断片（1711bp）をpCXND2-Flagにクローニングした。作製された発現プラスミドDNAをCHO細胞DXB11株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜により、可溶型GPC3高発現CHO株を得た。

1700 cm²ローラーボトルを用い可溶型GPC3高発現CHO株の大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養上清をDEAE sepharose Fast Flow (Amersham CAT# 17-0709-01) にチャージし、洗浄後、500mM NaClを含むバッファーにより溶出した。次に、Anti-Flag M2 agarose affinity gel (SIGMA CAT#A-2220) を用いてアフィニティー精製を行った。溶出は200 μ g/mLのFLAGペプチドにより行った。Centriprep-10 (Millipore CAT#4304) による濃縮後、Superdex 200 HR 10/30 (Amersham CAT# 17-1088-01) によるゲルろ過を行いFLAGペプチドを除去した。最後にDEAE sepharose Fast Flowカラムを用いて濃縮し、同時にTween20を含まないPBS (500mMのNaClを含む) で溶出を行うことによりバッファー置換を行った。

可溶型ヒトGPC3コアタンパク質の作製

上記野生型ヒトGPC3 cDNAをテンプレートとし、アッセンブリーPCR法によって495番目と509番目のSerをAlaに置換させたcDNAを作製した。この際、C末端にHisタグが付加されるようにプライマーを設計し、得られたcDNAをpCXND3ベクターにクローニングした。作製された発現プラスミドDNAをDXB11株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜により、可溶型GPC3コアタンパク質高発現CHO株を得た。

1700 cm²ローラーボトルを用い大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養上清をQ sepharose Fast Flow (Amersham CAT# 17-0510-01) にチャージし、洗浄後、500mM NaClを含むリン酸バッファーにより溶出した。次に、Chelating sepharose Fast Flow (Amersham CAT# 17-0575-01) を用いてアフィニティー精製を行った。10～150mMのイミダゾールでグラジエント溶出を行った。最後にQ sepharose Fast Flow を用いて濃縮し、500mM NaClを含むリン酸バッファーにより溶出した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、50～300kDaのスメアなバンドと、約40kDaのバンドが得られた。図2に電気泳動の結果を示す。GPC3は69kDaのC末端にヘパラン硫酸付加配列を有するプロテオグリカンである。スメアなバンドはヘパラン硫酸修飾を受けたGPC3であると考えられた。約40kDaのバンドはアミノ酸シーケンスの結果、GPC3のN末端側断片を起点としており、GPC3は何らかの

切断を受けていることが予想された。

以下のハイブリドーマのスクリーニングにおいてヘパラン硫酸に対する抗体を排除するため、ヘパラン硫酸付加シグナル配列である495番目と509番目のSerをAlaに置換させた可溶型GPC3コアタンパク質を作製した。同様にCHO高発現株を構築し、培養上清よりHisタグを利用したアフィニティー精製を行った。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、70kDa、40kDa、30kDaの3つのバンドが得られた。アミノ酸シーケンスの結果、30kDaのバンドはGPC3のC末端側断片であることが判明した。C末端断片は、359番目のセリン、もしくは375番目のバリンより開始しており、何らかの酵素的な切断を受けている事が予想された。ヘパラン硫酸付加型GPC3でこの30kDaのバンドが見られなかったのは、ヘパラン硫酸が付加しているためスミアなバンドになっていたためと思われる。GPC3が特定のアミノ酸配列で酵素的な切断を受けることは新しい知見であり、生物学的意義に関しては明らかにされていない。

本発明者らは、この結果より肝癌患者においても膜上のGPC3が切断を受け、可溶型としてGPC3が血中に分泌されるという仮説を立てた。GPC3は肝癌腫瘍マーカーであるAFPと比較してより早期肝癌患者で遺伝子の発現が高値であることを見出した（図1）ので、AFPより臨床的有用性の高い新しい腫瘍マーカーとしての可能性について検討するため、実施例2以降に記載のように、抗GPC3抗体を作製し、サンドイッチELISA系を構築した。

抗GPC3抗体の作製

ヒトGPC3とマウスGPC3のホモロジーはアミノ酸レベルで94%の高い相同性を示すため、通常のマウスに免疫しても抗GPC3抗体を得難い可能性を考え、自己免疫疾患マウスであるMRL/lprマウスを免疫動物として用いた。MRL/lprマウス(CRL)5匹に可溶型GPC3を免疫した。初回免疫には免疫タンパク質を100 μ g/匹となるように調製し、FCA（フロイント完全アジュバント（H37 Ra）、Difco（3113-60）、ベクトンディッキンソン（cat#231131））を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2週間後に50 μ g/匹となるように調製したものをFIA（フロイント不完全アジュバント、Difco（0639-60）、ベクトンディッキンソン

(cat#263910) でエマルジョン化したものを皮下に投与した。以降1週間間隔で追加免疫を合計5回行った。最終免疫については50 μ g/匹となるようにPBSに希釈し尾静脈内に投与した。GPC3コアタンパク質をコートしたイムノプレートを用いたELISAによりGPC3に対する血清中の抗体価が飽和しているのを確認後、マウスミエローマ細胞P3U1とマウス脾臓細胞を混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティック、cat#783 641) により細胞融合を行った。96穴培養プレートに播種し、翌日よりHAT培地で選択後培養上清をELISAでスクリーニングした。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した後、拡大培養を行い培養上清を回収した。ELISAによるスクリーニングは、GPC3コアタンパク質との結合活性を指標に行い、強い結合能を有する抗GPC3抗体を6クローン得た。

抗体の精製はHi Trap ProteinG HP (Amersham CAT#17-0404-01) を用いて行った。ハイブリドーマ培養上清を直接カラムにチャージし、結合バッファー (20mM リン酸ナトリウム (pH7.0)) にて洗浄後、溶出バッファー (0.1M グリシン-HCl (pH2.7)) で溶出した。溶出は中和バッファー (1M Tris-HCl (pH9.0)) を加えたチューブに行い直ちに中和した。抗体画分をプールした後、0.05% Tween20/PBSで一昼夜透析を行いバッファー置換した。精製された抗体は0.02%となるようにNa₂S₂O₃を添加した後、4℃で保管した。

抗GPC3抗体の解析

抗体濃度はヤギ抗マウス IgG (gamma) (ZYMED CAT# 62-6600) とアルカリフォスファターゼ - ヤギ抗マウス IgG (gamma) (ZYMED CAT# 62-6622) を用いたマウスIgGサンドイッチELISAを行い、市販の精製マウスIgG1抗体 (ZYMED CAT#02-6100) をスタンダードとして定量した。

抗GPC3抗体のアイソタイピングは、ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit II (PIERCE CAT# 37502) を用い、方法は添付のマニュアルに従った。アイソタイピングの結果全てIgG1タイプであった。

GPC3コアタンパク質を用いたウエスタンブロッティングにより抗GPC3抗体のエピトープ分類を行った。100ng/レーンとなるように可溶型GPC3コアタンパク質を

10%SDS-PAGE mini (TEFCO CAT#01-075) にチャージし、電気泳動 (60V 30min, 120V 90min) 後、Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) を用いてイモビロン-P (Millipore CAT#IPVH R85 10) へトランスファした (15V 60min)。membraneをTBS-T (0.05% Tween20, TBS) で軽く洗った後、5%スキムミルク入りTBS-Tで1時間 (室温) あるいは一晩 (4℃) 振とうした。TBS-Tで約10分間振とうした後、1%スキムミルク入りTBS-Tで0.1~10 μ g/mLに希釈した各抗GPC3抗体を加え1時間振とうした。TBS-Tで洗い (10分間x3回)、1%スキムミルク入りTBS-Tで1.1000に希釈したHRP-抗マウスIgG抗体 (Amersham CAT#NA931) で1時間振とう後、TBS-Tで洗った (10分x3回)。発色はECL-Plus (Amersham RPN2132) を用いて行い、Hyperfilm ECL (Amersham CAT# RPN2103K) を用いて現像した。図4にウエスタンブロット解析の結果を示す。40kDaのバンドに反応する抗体はN末端にエピトープを有し、30kDaのバンドに反応する抗体はC末端にエピトープを有すると判断し分類した。N末端側を認識する抗体としてM6B1、M18D4、M19B11、C末端側を認識する抗体としてM3C11、M13B3、M3B8を得た。BIAcoreを用いた解析の結果、各抗体のKD値は0.2~17.6nMであった。

実施例3 可溶性GPC3の検出

マウス異種移植 (xenograft) モデル

6週令雌性のSCIDマウス (Fox CHASE C.B-17/Icr-scid Jcl、日本クレア株式会社) およびヌードマウス (BALB/cA Jcl-nu、日本クレア株式会社) の腹部皮下へヒト肝癌HepG2細胞を300万個移植した。腫瘍が十分に形成された53日後にHepG2移植SCIDマウス#1, 3, 4の後大静脈より全採血し、EDTA-2Naとアプロチニン存在下 (ニプロネオチューブ真空採血管、NIPRO、NT-EA0205) で血漿を調製し、測定日まで-20℃で保管した。なお、HepG2移植SCIDマウス#2はHepG2移植62日後に、HepG2移植ヌードマウス#1, 2は移植66日後に後大静脈より全採血した。対照として、同週令の正常SCIDマウスから同様の操作で血漿を調製した。

サンドイッチELISA

血中の可溶型GPC3を検出するため、GPC3のサンドイッチELISA系を構築した。96ウェルプレートにコートする抗体にはM6B1を、M6B1に結合したGPC3を検出する抗体としてビオチンで標識したM18D4を用いた。発色には高い検出感度を達成するためDAKO社のAMPAKを用いた。

96ウェルイムノプレートに10 μ g/mLとなるように抗GPC3抗体をコーティングバッファー (0.1M NaHCO_3 (pH9.6), 0.02% (w/v) NaN_3) で希釈したものをコートし、4℃で一晩インキュベートした。翌日300 μ L/wellの洗浄バッファー (0.05% (v/v) Tween20, PBS) で3回洗浄後、200 μ Lの希釈バッファー (50mM Tris-HCl (pH8.1), 1mM MgCl_2 , 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20, 0.02% (w/v) NaN_3 , 1% (w/v) BSA) を加えブロッキングを行った。室温で数時間後、あるいは4℃で一晩保管後、マウス血漿、あるいは培養上清を希釈バッファーで適当に希釈したものを加え1時間室温でインキュベートした。300 μ L/ウェルのRBで3回洗浄後、希釈バッファーで10 μ g/mLとなるように希釈したビオチン標識した抗GPC3抗体を加え1時間室温でインキュベートした。300 μ L/ウェルのRBで3回洗浄後、希釈バッファーで1/1000に希釈したAP-ストレプトアビジン (ZYMED) を加え、1時間室温でインキュベートした。300 μ L/wellの洗浄バッファーで5回洗浄した後、添付のプロトコールに従いAMPAK (DAKO CAT#K6200) を用いて発色させ、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

抗体のビオチン化にはRoche社のBiotin Labeling Kit (CAT# 1 418 165) を用いた。また、サンプル中の可溶型GPC3濃度の換算には、表計算ソフトGlaphPad PRISM (GlaphPad software Inc. ver. 3.0) を用いて解析した。図5に本実施例のサンドイッチELISAの原理を示す。

精製可溶型GPC3を用いてスタンダードカーブを作製した結果、検出限界が数ng/mLの系を構築することができた。図6にM6B1およびM18D4を用いたGPC3サンドイッチELISAのスタンダードカーブを示した。この系を用い、前述のHepG2の培養上清、及びヒト肝癌HepG2細胞を移植したマウス血清中の分泌型GPC3の検出を試みた。コントロールの培地、及びコントロールマウス血清では可溶型GPC3は検出限界以下であったのに対し、HepG2の培養上清、及びヒト肝癌HepG2細胞を移植し

たマウス血清中に可溶性GPC3が検出された。精製可溶性GPC3の濃度に換算すると、HepG2培養上清では1.2 μ g/mL、マウス血清でも23~90ng/mLであった（表1）。

表 1

HepG2移植マウスplasma中の可溶性GPC3濃度の測定 (ng/mL)

	腫瘍体積(mm ³)	M6B01(N) - M18D4(N)	M19B11(N) - M18D4(N)	M6B1(N) - BioM3C11(C)	M13B3(C) - BioM18D4(N)	M13B3(C) - BioM3B8(C)
HepG2培養上清		1190	1736	224	234	<1
HepG2移植SCIDマウス #1	2022	65.4	76.9	<10	<10	<10
HepG2移植SCIDマウス #2	1705	71.7	94.8	<10	<10	<10
HepG2移植SCIDマウス #3	2257	90.3	113.9	<10	<10	<10
HepG2移植SCIDマウス #4	2081	87.3	107.3	<10	15.0	<10
HepG2移植nudeマウス #1	1994	58.7	53.6	19.7	35.5	102.2
HepG2移植nudeマウス #2	190 & 549	22.9	33.6	<10	11.5	40.6
Normal SCIDマウス #1	0	<10	<10	<10	<10	<10
Normal SCIDマウス #2	0	<10	<10	<10	<10	<10
Normal SCIDマウス #3	0	<10	<10	<10	<10	<10

分泌型GPC3の構造

先に立てた仮説通り、血中可溶化GPC3がN末端断片の構造をとっているかについて検討を行った。分泌型GPC3がN末端断片であった場合、N末端認識抗体とC末端認識抗体の組み合わせのサンドイッチELISAでは検出できないと考えられる。N末端断片を認識する抗体及びC末端側断片を認識する抗体それぞれ3種ずつを用いて、様々な組み合わせのサンドイッチELISA系を構築した。図7に分泌可溶性型GPC3の構造を、図8に抗体の組み合わせを示す。図9にこのサンドイッチELISAのスタンダードカーブを示す。表1に測定結果を示すが、表1に示すようにHepG2の培養上清、及びヒト肝癌HepG2細胞を移植したマウス血清中の分泌型GPC3の検出はN末端側断片認識抗体同士の組み合わせでは高い値を示し、C末端断片認識抗体を含む系では多くのマウスで検出限界以下であった。このことから、今回明らかになった分泌型GPC3はN末端断片が優位であることが予想された。すなわち、GPC3のアミノ酸第1番目から第374番目のアミノ酸配列に対する抗体を用いる事により、血中可溶化GPC3の検出が高感度に行われる可能性が考えられた。

実施例4 抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体の作製

ヒトGPC3に結合する抗体（ヒトGPC3-C末端認識抗体：M3C11、M1E07、ヒトGPC3-N末端認識抗体：M19B11、M18D04、M5B09、M10D02）を産生するハイブリドー

マより抽出したTotal RNAを用いて、RT-PCR法によって増幅した。Total RNAは、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN社製) を用いて 1×10^7 細胞のハイブリドーマより抽出した。 $1 \mu\text{g}$ のTotal RNAを使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社製)、マウスIgG1定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG1 (配列番号: 7) またはマウス κ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドkappa (配列番号: 8) を用い、5'末端側遺伝子断片を増幅した。逆転写反応は42℃で1時間30分間反応した。PCR溶液50 μL は、5 μL の10 \times Advantage 2 PCR Buffer、5 μL の10 \times Universal Primer A Mix、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1 μL のAdvantage 2 Polymerase Mix (以上、CLONTECH社製)、2.5 μL の逆転写反応産物、10pmoleの合成オリゴヌクレオチドMHC-IgG1またはkappaを含有し、94℃の初期温度にて30秒間そして94℃にて5秒間、72℃にて3分間のサイクルを5回反復し、94℃にて5秒間、70℃にて10秒間、72℃にて3分間のサイクルを5回反復し、さらに94℃にて5秒間、68℃にて10秒間、72℃にて3分間のサイクルを25回反復した。最後に反応産物を72℃で7分間加熱した。各PCR産物はQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) へクローニングし、塩基配列を決定した。

次に各抗体のH鎖およびL鎖可変領域配列をヒトH鎖およびヒトL鎖定常領域配列に連結した。各抗体のH鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよびNheI部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をヒトIgG1定常領域がpBluescript KS+ベクター (東洋紡社製) に挿入されているpB-CHベクターにクローニングした。NheI部位により、マウスH鎖可変領域とヒトH鎖 ($\gamma 1$ 鎖) 定常領域が連結している。作製されたH鎖遺伝子断片を発現ベクターpCXND3にクローニングした。本ベクターpCXND3の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (W092/19759参照) の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI/SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後、EcoRI-NotI-BamHI adaptor (宝酒造社製) をクローニングした。このベ

クターをpCHOIと命名した。pCHOIのDHFR遺伝子発現部位をpCXN (Niwaら、Gene 1991;108:193-200) の制限酵素HindIII部位にクローニングしたベクターをpCXND3と命名した。本プラスミドに含まれる抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体 (M3C11、M1E07、M19B11、M18D04) のH鎖の塩基配列をそれぞれ配列番号：9、11、13、15にアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：10、12、14、16に示す。また、各抗体のL鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよびBsiWI部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いてPCRを行い、得られたPCR産物をヒトkappa鎖定常領域がpBluescript KS+ベクター (東洋紡社製) に挿入されているpB-CLベクターにクローニングした。BsiWI部位により、ヒトL鎖可変領域と定常領域が連結している。作製されたL鎖遺伝子断片を発現ベクターpUCAGクローニングした。本ベクターpUCAGは、pCXN (Niwaら、Gene 1991;108:193-200) を制限酵素BamHIで消化して得られる2.6kbpの断片をpUC19ベクター (東洋紡社製) の制限酵素BamHI部位に連結し、クローニングしたベクターである。本プラスミドに含まれる抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体 (M3C11、M1E07、M19B11、M18D04) のL鎖の塩基配列をそれぞれ配列番号：17、19、21、23にアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：18、20、22、24に示す。

抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体発現ベクターを作製するために、L鎖遺伝子断片が挿入されたpUCAGベクターを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で消化して得られる遺伝子断片をH鎖遺伝子が挿入されたpCXND3の制限酵素HindIII切断部位に連結し、クローニングした。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体遺伝子を発現する。

CHO細胞 (DG44株) を用いた安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。Gene PulserII (Bio Rad社製) を用いたエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。25 μ gの各抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体発現ベクターとPBSに懸濁したCHO細胞 (1×10^7 細胞/ml) の0.75mlを混合したものを氷上で10分間冷却し、キュベットに移した後に1.5kV、25 μ FDの容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT

supplement (Invitrogen社製) を1倍濃度で含むCHO-S-SFMII培地 (Invitrogen社製) 40mLに懸濁した。同様の培地で50倍希釈溶液を作製し、96ウェル培養用プレートに100 μ L /ウェルで分注した。CO₂インキュベーター (5 % CO₂) で24時間培養後、Geneticin (Invitrogen社製) を0.5mg/mLになるように添加して2週間培養した。Geneticin耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中のIgG量について以下に示す濃度定量法で測定した。高産生細胞株を順次拡大培養し、抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体安定発現細胞株を取得し、大量培養を行い、培養上清を得た。

培養上清中のIgG濃度の測定は、Goat Anti-Human IgG (BIOSORCE社製) とGoat Anti-Human IgG Alkaline Phosphatase conjugated (BIOSORCE社製) を用いたヒトIgGサンドイッチELISAを行い、市販の精製ヒトIgG (Cappel社製) との比較により定量した。

各抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体の精製は、Hi Trap ProteinG HP (Amersham社製) を用いて行った。抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体産生CHO細胞株の培養上清を直接カラムにチャージし、結合バッファー (0.1Mグリシン-HCl (pH2.7)) で溶出した。中和バッファー (1M Tris-HCl (pH9.0)) を加えたチューブに溶出し、直ちに中和した。抗体画分をプールした後、0.05 % Tween20/PBSで一昼夜透析を行い、バッファーを置換した。精製された抗体は0.02 % となるようにNaN₃を添加した後、4℃で保管した。

実施例5 抗GPC3マウス-ヒトキメラ抗体の作製

全長ヒトGPC3 cDNAがクローニングされたpGEM-T Easyベクターを制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で消化して得られるヒトGPC3 cDNAを発現ベクターpCOS2にクローニングした。本ベクターpCOS2の構築の流れについて、以下に述べる。DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (W092/19759参照) の抗体H鎖遺伝子とベクターを分割するために、制限酵素EcoRI/SmaI部位で消化し、ベクター側のみ回収した後に、EcoRI-NotI-BamHI adaptor (宝酒造社製) をクローニングした。このベクターをpCHO1と命名した。さらに、pCHO1のDHFR遺伝子発現部位を除去し、HEF-VH-g γ 1 (Sato Kら、Mol. Immunol. 1994;31:371-381) のNeomycin耐性遺伝子発現部位を

挿入した。このベクターをpCOS2と命名した

全長ヒトGPC3安定発現細胞株の作製は次のようにして行った。10 μ g の全長ヒトGPC3遺伝子発現ベクターと60 μ L のSuperFect (QIAGEN社製) を混合し、複合体を形成させた後に、CHO細胞DXB11株に添加することにより、遺伝子導入を行った。CO₂インキュベーター (5 % CO₂) で24時間培養後、終濃度0.5mg/mLのGeneticin (Invitrogen社製) および10 % FBS (GIBCO BRL社製) を含む α MEM (GIBCO BRL社製) を用いて、選抜を開始した。得られたGeneticin耐性コロニーを集め、限界希釈法により細胞のクローニングを行った。それぞれの細胞クローンを可溶化し、抗GPC3抗体を用いたウエスタンブロットにより全長ヒトGPC3の発現を確認し、安定発現細胞株を取得した。

実施例 6 ヒト末梢血由来PBMCを用いたADCC活性の測定

(1) ヒトPBMC溶液の調製

健常人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS (-) で2倍に希釈し、Ficoll-PaqueTM PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB) に重層した。これを遠心 (500 \times g、30分間、20 $^{\circ}$ C) した後、単核球画分である中間層を分取した。3回洗浄後、10% FBS/RPMIに懸濁し、ヒトPBMC溶液とした。

(2) 標的細胞の調製

10%FBS/RPMI1640培地で培養したHepG2細胞を、トリプシン-EDTA (Invitrogen Corp) を用いてディッシュから剥離し、96ウェルU字底プレート (Falcon) の各ウェルに1 \times 10⁴細胞/ウェルで分注し、2日間培養した。培養後、5.55MBqのChromium-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37 $^{\circ}$ C 1時間培養し、この細胞を培地で1回洗浄し、50 μ Lの10%FBS/RPMI1640培地を加え標的細胞とした。

(3) クロム遊離試験 (ADCC活性)

標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液50 μ Lを添加し、氷上で15分反応させた後に、ヒトPBMC溶液100 μ L (5 \times 10⁵ 細胞/ウェル) を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37 $^{\circ}$ C 4時間培養し、培養後、プレートを遠心分離し、培養上清100 μ L中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率 (\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Bは標的細胞に2% NP-40水溶液 (Nonidet P-40、Code No. 252-23、ナカライテスク株式会社) を100 μ L、10%FBS/RPMI培地を50 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Cは標的細胞に10%FBS/RPMI培地を150 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値を示す。試験はtriplicateにて行い、ADCC活性 (%) について平均値及び標準誤差を算出した。

その結果を第10図に示した。6種類の抗GPC3キメラ抗体のうち、C末端認識抗体であるch. M3C11とch. M1E07がADCC活性を示したのに対して、N末端認識抗体であるch. M19B11, ch. M18D04, ch. M5E09, ch. M10D02はほとんどADCC活性を示さなかった。以上の結果はキメラ抗体のADCC活性は抗体の認識部位によって異なることを示しており、さらに、切断点よりC末端側を認識する抗体がADCC活性を示したことから、GPC3のC末端認識抗体は臨床応用上有用であることが予想された。

実施例7 補体依存性細胞障害活性 (CDC活性) の測定

(1) Human Albumin Veronal Buffer (HAVB) の作製

NaCl (特級、和光純薬工業株式会社) 12.75 g、Na-barbital (特級、和光純薬工業株式会社) 0.5625 g、barbital (特級、和光純薬工業株式会社) 0.8625 gをミリQ水に溶解し200 mLとした後、オートクレーブ処理 (121℃、20分間) した。オートクレーブ処理した100 mLの温ミリQ水を加え、pH7.43を確認した (推奨 pH7.5)。これを5×Veronal Bufferとした。CaCl₂·2H₂O (特級、純正化学株式会社) 0.2205 gを50 mLミリQ水に溶解し0.03 mol/Lとし、CaCl₂溶液とした。MgCl₂·6H₂O (特級、純正化学株式会社) 1.0165 gを50 mLミリQ水に溶解し0.1 mol/Lとし、MgCl₂溶液とした。5×Veronal Buffer 100 mL、ヒト血清アルブミン (ブミネート®25%、ヒト血清アルブミン濃度250 mg/mL、バクスター株式会社) 4 mL、CaCl₂溶液2.5 mL、MgCl₂溶液 2.5 mL、KCl (特級、純正化学株式会社) 0.1 g、glucose (D(+)-グルコース、ブドウ糖無水、特級、和光純薬工業株式会社) 0.5 gをミリQ水に溶解し500 mLとした。これをHAVBとした。ろ過滅菌後、

設定温度5℃にて保存した。

(2) 標的細胞の調製

実施例4で作製されたGPC3を細胞膜上に発現させたCHO細胞は、10%FBSと0.5mg/mL Geneticin (GIBCO) を添加した(-MEM核酸(+)) 培地 (GIBCO) で培養し、細胞剥離緩衝液 (Invitrogen Corp) を用いてディッシュから剥離して、96ウェル平底プレート (Falcon) の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、3日間培養した。培養後、5.55MBqのChromium-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃ 1時間培養し、この細胞をHAVBで2回洗浄し、50 μ LのHAVBを加え標的細胞とした。

(3) クロム遊離試験 (CDC活性)

各キメラ抗体をHAVBで希釈して40 μ g/mLの抗体溶液とした。標的細胞に抗体溶液を50 μ Lずつ添加し、氷上にて15分間静置した。続いて、各ウェルにHAVBにて希釈した幼若ウサギ補体 (Cedarlane) を終濃度30%になるよう100 μ Lずつ添加し (抗体の終濃度10 μ g/mL)、5%炭酸ガスインキュベーター中に37℃で90分間静置した。プレートを遠心分離後、各ウェルより上清を100 μ Lずつ回収し、ガンマカウンターにて放射活性を測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率 (\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性 (cpm)、Bは標的細胞に2% NP-40水溶液 (Nonidet P-40、Code No. 252-23、ナカライテスク株式会社) を100 μ L、HAVBを50 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、Cは標的細胞にHAVBを150 μ L添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値を示す。試験はtriplicateにて行い、CDC活性 (%) について平均値及び標準誤差を算出した。

その結果を第11図に示した。6種類の抗GPC3キメラ抗体のうち、C末端認識抗体であるch. M3C11とch. M1E07がCDC活性を示したのに対して、N末端認識抗体であるch. M19B11, ch. M18D04, ch. M5E09, ch. M10D02はいずれも低いCDC活性しか示さなかった。以上の結果はキメラ抗体のCDC活性は抗体の認識部位によって異なることを示しており、さらに、切断点よりC末端側を認識する抗体がCDC活性を示したことから、GPC3のC末端認識抗体は臨床応用上有用であることが予想された。

実施例に示したように、肝癌細胞で高発現しているGPC3は一部分泌型として血液中に存在する可能性が示された。GPC3は肝癌マーカーであるAFPよりも早期の癌で遺伝子発現が認められるので、GPC3の検出は癌の診断として有用であると考えられる。GPC3は肝癌細胞株以外に、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、膵臓癌、リンパ腫などの癌細胞株においても発現が確認されているので、肝癌以外の診断にも適用できる可能性がある。

また、血中可溶化GPC3は、可溶型GPC3コアタンパク質で認められた約40kDaのN末端断片が優位である可能性が示された。このことから診断用抗体としてはN末端断片認識抗体が有用と考えられる。また、ADCC活性及びCDC活性を有する肝癌治療用抗体としてはC末端断片認識抗体を用いれば、血中の分泌型GPC3にトラップされることなく効率的に肝癌細胞に到達することが可能であり、癌細胞破壊剤、抗癌剤として有用である。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであろう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

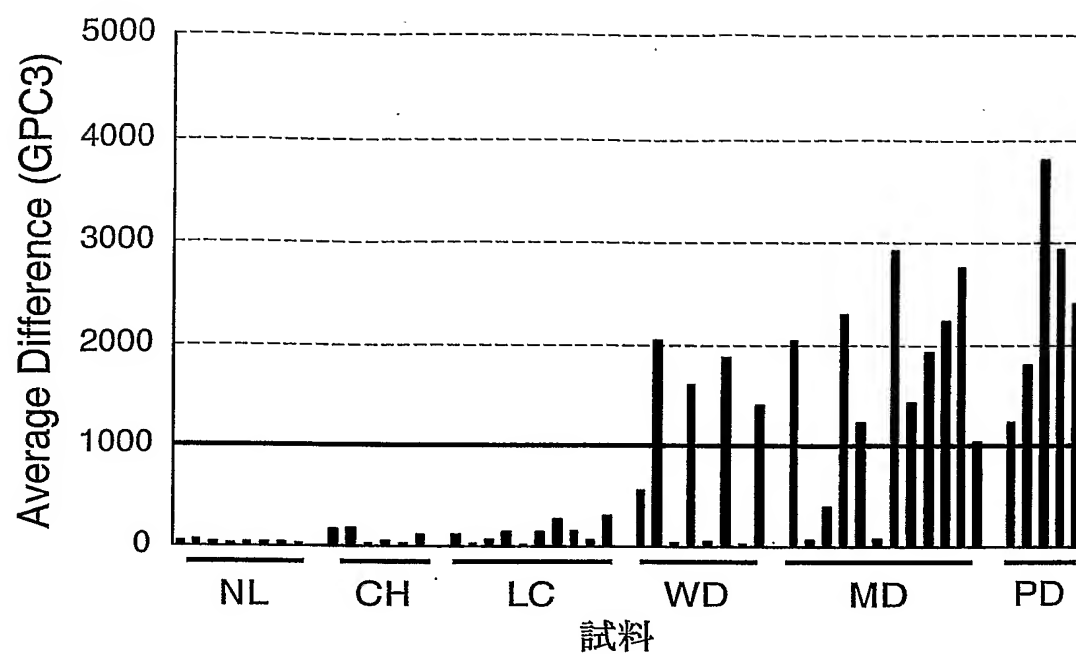
請求の範囲

1. GPC3のN端ペプチドに対する抗体。
2. GPC3のN端ペプチドが血中可溶化ペプチドである請求項1記載の抗体。
3. GPC3のN端ペプチドがGPC3の第1番目のアミノ酸から第374番目のアミノ酸からなるペプチド又は第1番目のアミノ酸から第358番目のアミノ酸からなるペプチドである請求項2記載の抗体。
4. GPC3のN端ペプチドがGPC3の第1番目のアミノ酸から第358番目のアミノ酸からなるペプチドである請求項3記載の抗体。
5. モノクローナル抗体である請求項1から4のいずれか1項に記載の抗体。
6. 不溶性支持体に固定されていることを特徴とする請求項1記載の抗体。
7. 標識物質で標識されていることを特徴とする請求項1記載の抗体。
8. GPC3のC端ペプチドに対する抗体。
9. GPC3のC端ペプチドがGPC3の第359番目のアミノ酸から第580番目のアミノ酸からなるペプチド又は第375番目のアミノ酸から第580番目のアミノ酸からなるペプチドである請求項8記載の抗体。
10. GPC3のC端ペプチドがGPC3の第359番目のアミノ酸から第580番目のアミノ酸からなるペプチドである請求項9記載の抗体。
11. モノクローナル抗体である請求項8から10いずれかに記載の抗体。

- 1 2. キメラ抗体である請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 3. 細胞傷害抗体である請求項 7 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。
- 1 4. 請求項 7 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む細胞破壊剤。
- 1 5. 細胞が癌細胞である請求項 1 4 記載の細胞破壊剤。
- 1 6. 請求項 8 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む抗癌剤。
- 1 7. 請求項 8 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を細胞と接触させることを含む、細胞傷害を引き起こす方法。
- 1 8. 細胞が癌細胞である請求項 1 7 記載の方法。

図 1

A.



B.

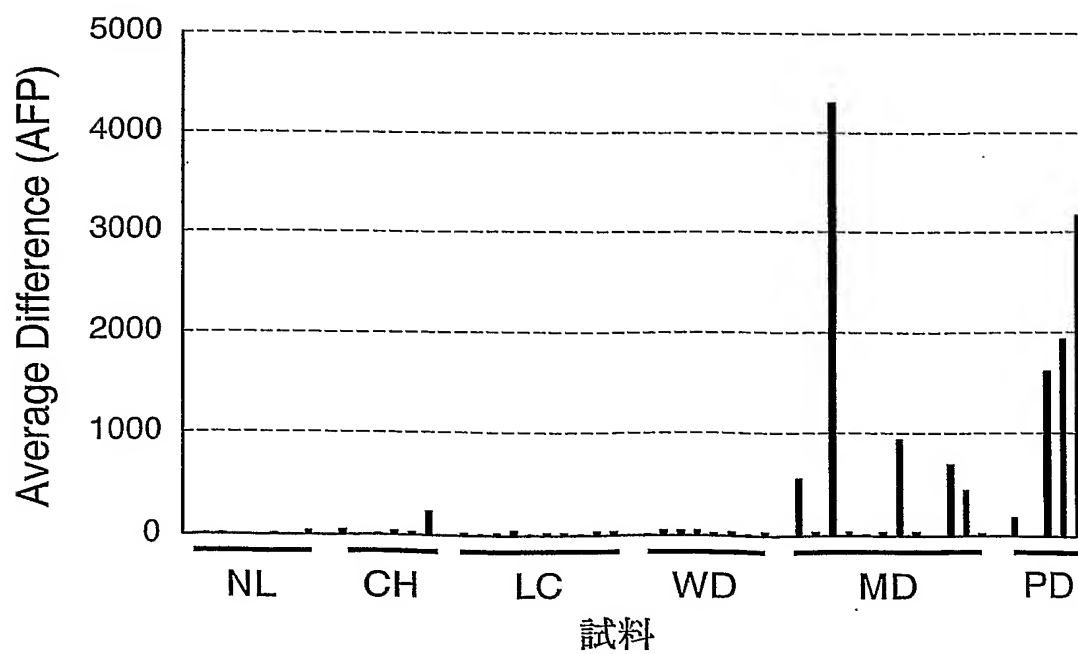


図 2

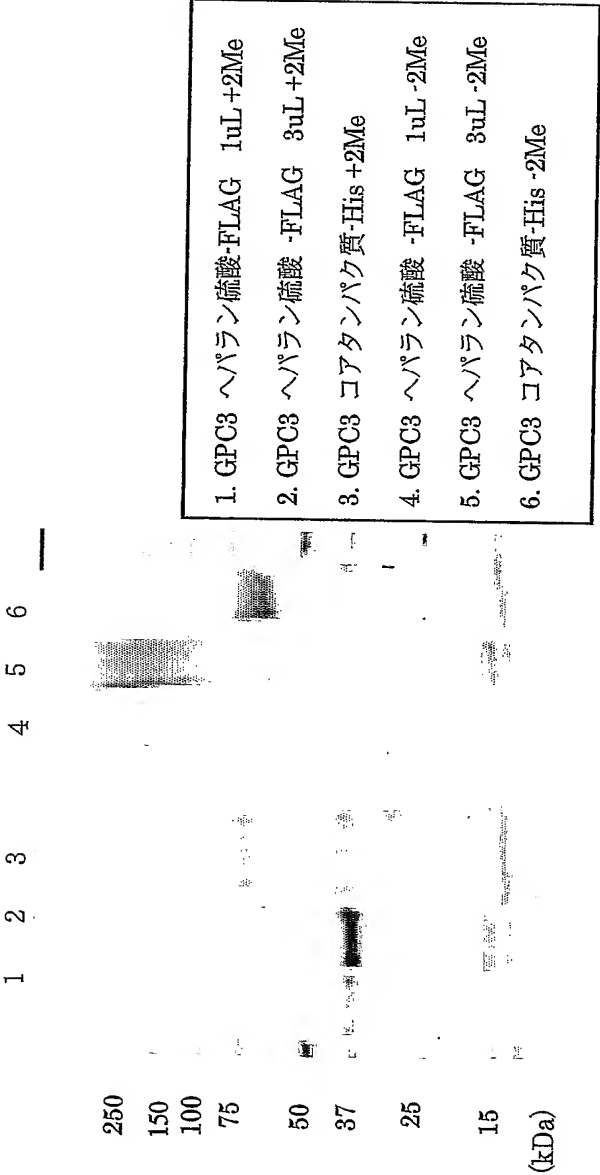


图 3

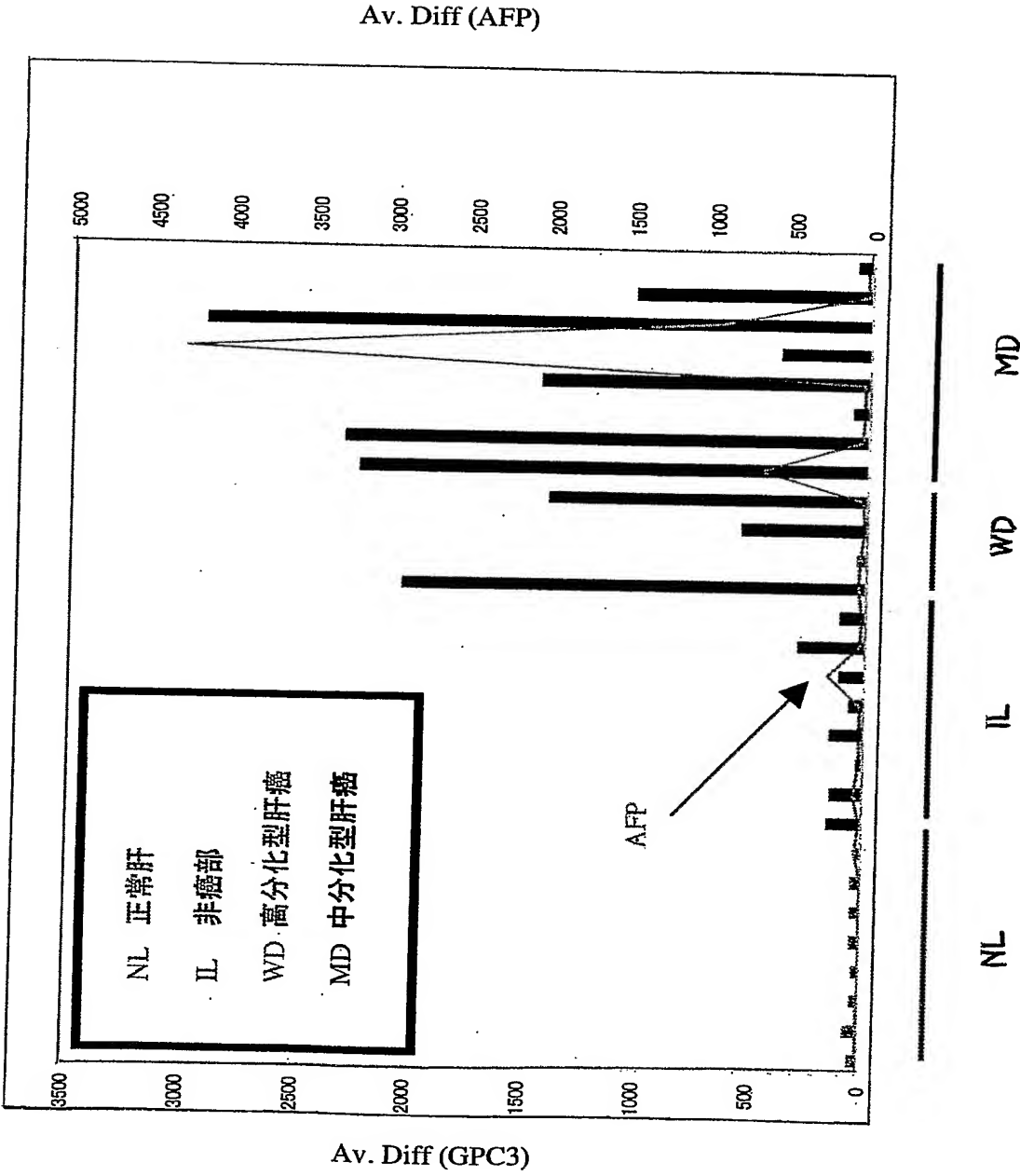


図 4

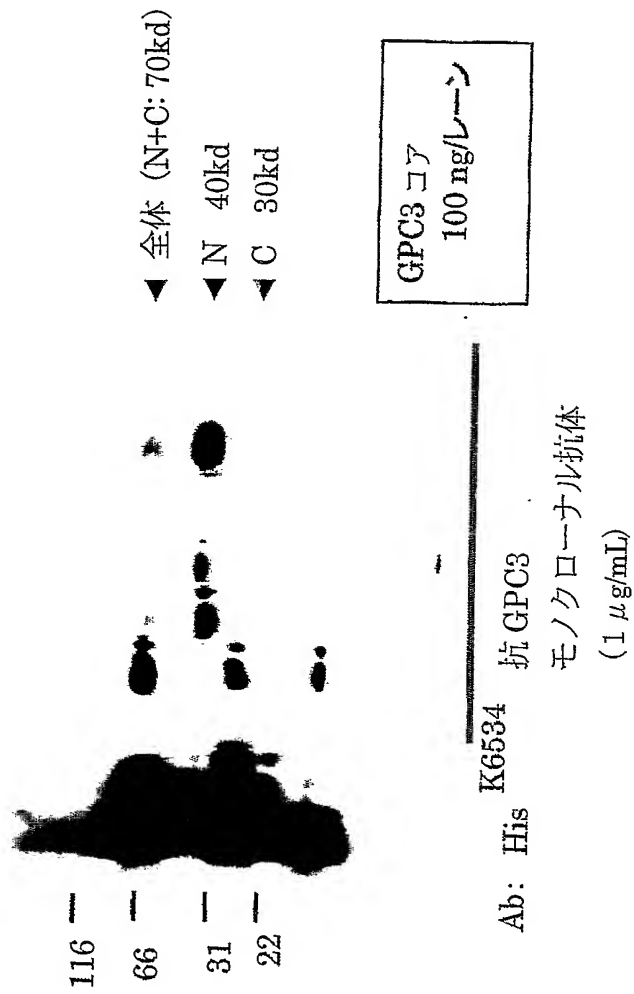


図 5

OD測定

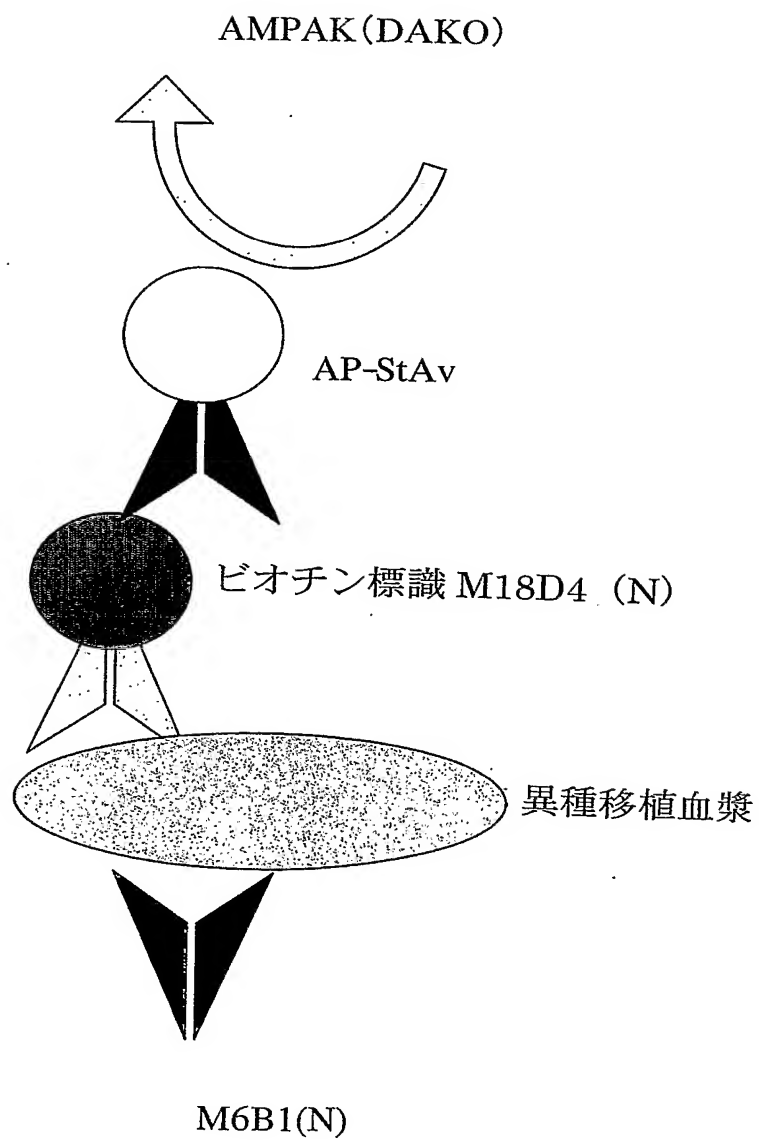


図 6

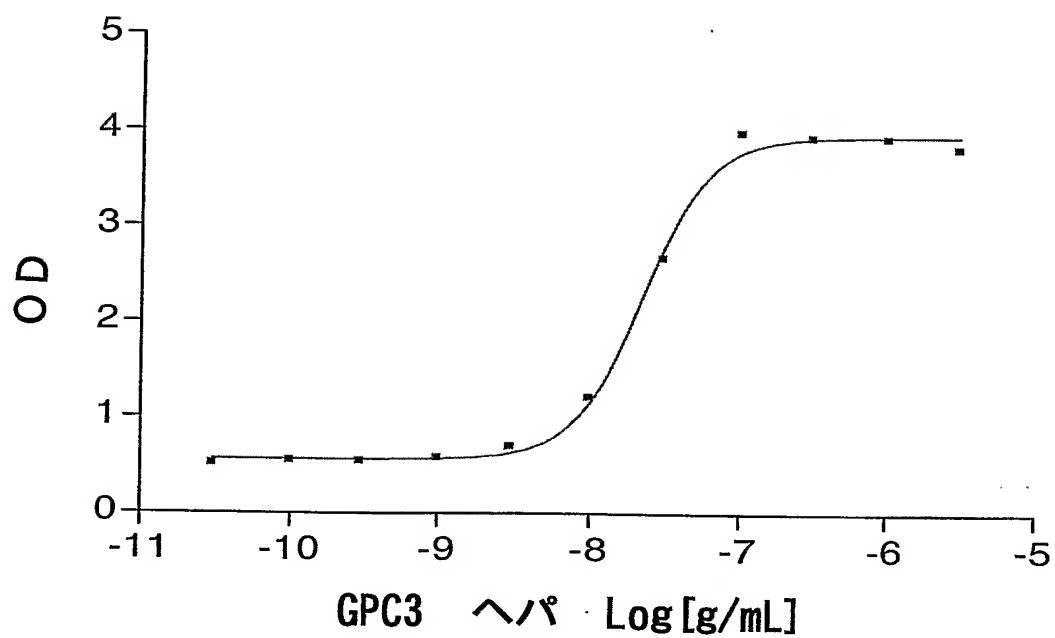


図 7

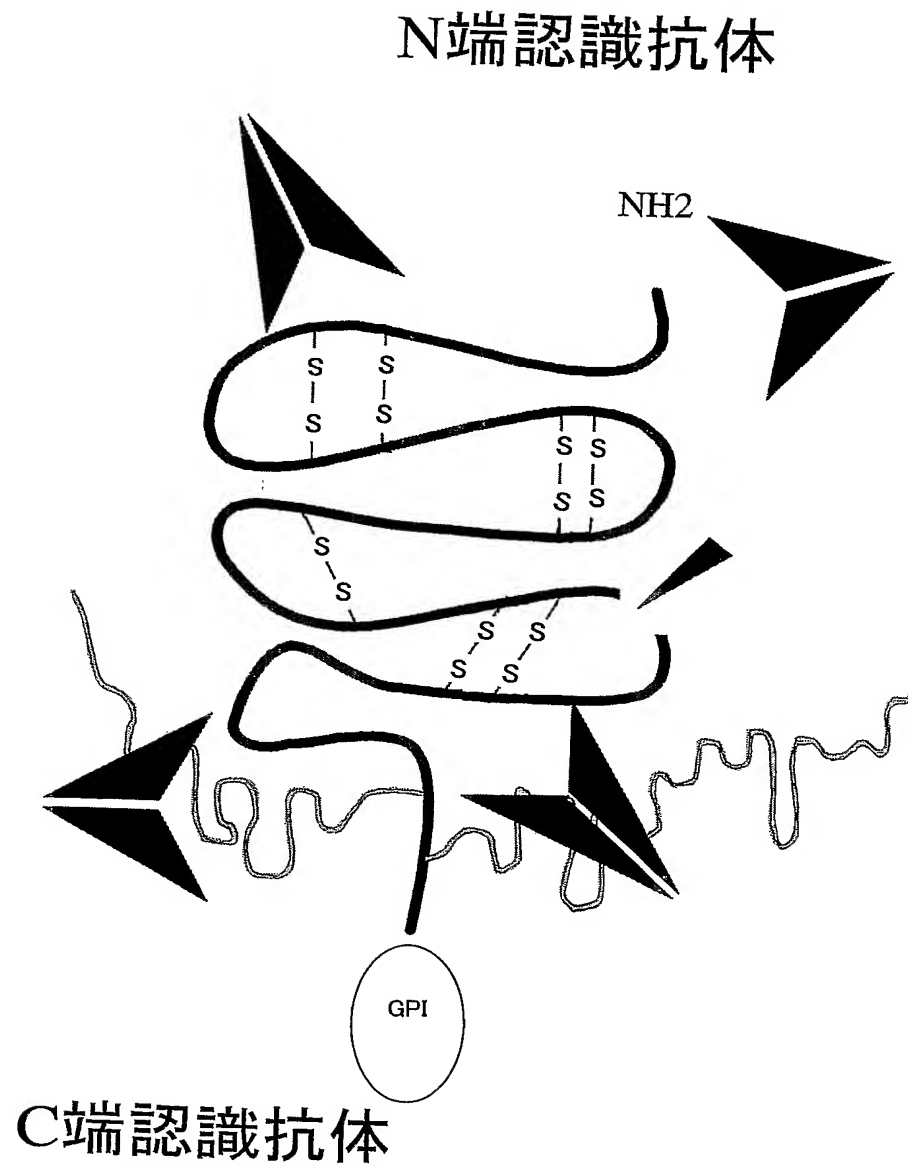
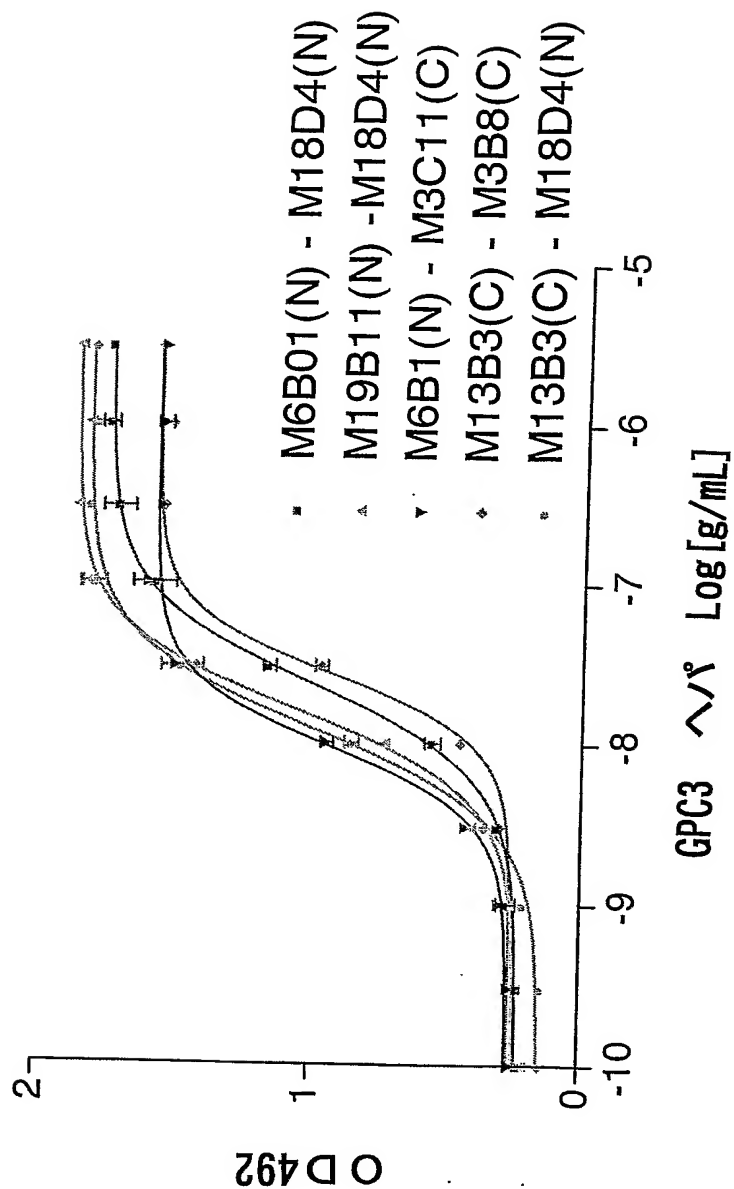


図 8

可溶型GPC3の形態			
	N端のみ	N+C	C端のみ
N-N ELISA	+	+	—
N-C ELISA	—	+	—
C-C ELISA	—	+	+

図 9



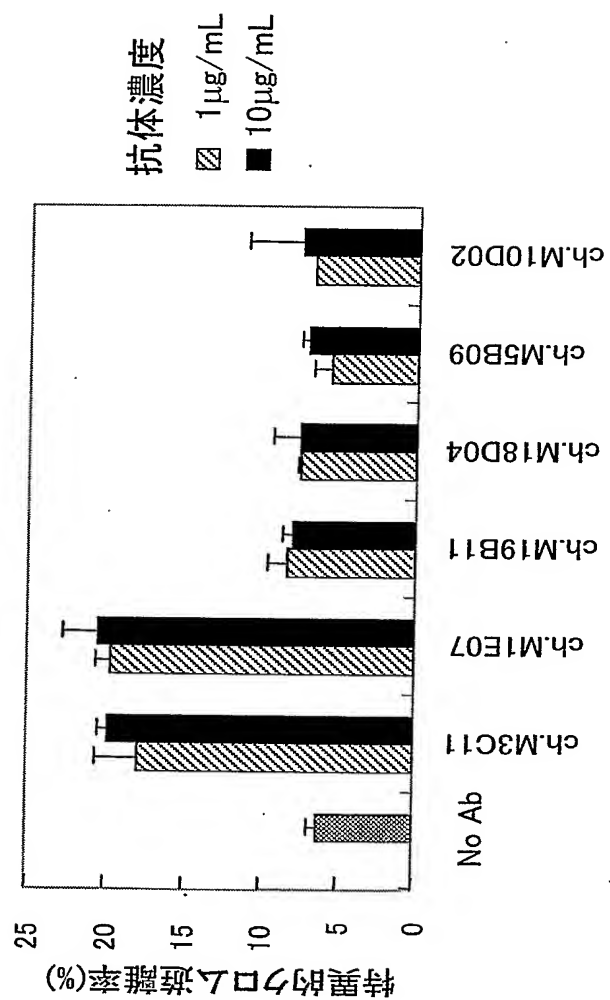


図10

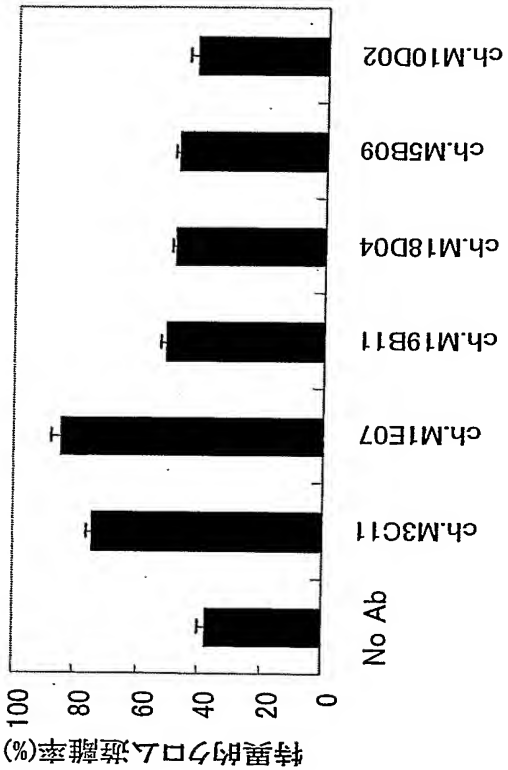


図11

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> An antibody against blood-soluble N terminal peptide or C terminal peptide of GPC3

<130> PH-1875-PCT

<140>

<141>

<150> PCT/JP02/08999

<151> 2002-09-04

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

gatatcatgg ccgggaccgt gcgcaccgcg t

1/63

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

gctagctcag tgcaccagga agaagaagca c

31

<210> 3

<211> 2300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (109).. (1851)

<400> 3

cagcacgtct ctgtctcctc agggccactg ccaggcttgc cgagtcctgg gactgctctc 60

gctccggctg ccactctccc gcgctctcct agctccctgc gaagcagg atg gcc ggg 117

Met Ala Gly

1

acc gtg cgc acc gcg tgc ttg gtg gtg gcg atg ctg ctc agc ttg gac 165
 Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu Ser Leu Asp
 5 10 15

ttc ccg gga cag gcg cag ccc ccg ccg ccg ccg ccg gac gcc acc tgt 213
 Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys
 20 25 30 35

cac caa gtc cgc tcc ttc ttc cag aga ctg cag ccc gga ctc aag tgg 261
 His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp
 40 45 50

gtg cca gaa act ccc gtg cca gga tca gat ttg caa gta tgt ctc cct 309
 Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro
 55 60 65

aag ggc cca aca tgc tgc tca aga aag atg gaa gaa aaa tac caa cta 357
 Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu
 70 75 80

aca gca cga ttg aac atg gaa cag ctg ctt cag tct gca agt atg gag 405
 Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu
 85 90 95

ctc aag ttc tta att att cag aat gct gcg gtt ttc caa gag gcc ttt 453
 Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe
 100 105 110 115

gaa att gtt gtt cgc cat gcc aag aac tac acc aat gcc atg ttc aag 501

Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys
 120 125 130

aac aac tac cca agc ctg act cca caa gct ttt gag ttt gtg ggt gaa 549
 Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu
 135 140 145

ttt ttc aca gat gtg tct ctc tac atc ttg ggt tct gac atc aat gta 597
 Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val
 150 155 160

gat gac atg gtc aat gaa ttg ttt gac agc ctg ttt cca gtc atc tat 645
 Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr
 165 170 175

acc cag cta atg aac cca ggc ctg cct gat tca gcc ttg gac atc aat 693
 Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn
 180 185 190 195

gag tgc ctc cga gga gca aga cgt gac ctg aaa gta ttt ggg aat ttc 741
 Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe
 200 205 210

ccc aag ctt att atg acc cag gtt tcc aag tca ctg caa gtc act agg 789
 Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg
 215 220 225

atc ttc ctt cag gct ctg aat ctt gga att gaa gtg atc aac aca act 837
 Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr

230	235	240	
gat cac ctg aag ttc agt aag gac tgt ggc cga atg ctc acc aga atg 885			
Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met			
245	250	255	
tgg tac tgc tct tac tgc cag gga ctg atg atg gtt aaa ccc tgt ggc 933			
Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly			
260	265	270	275
ggc tac tgc aat gtg gtc atg caa ggc tgt atg gca ggt gtg gtg gag 981			
Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu			
	280	285	290
att gac aag tac tgg aga gaa tac att ctg tcc ctt gaa gaa ctt gtg 1029			
Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val			
	295	300	305
aat ggc atg tac aga atc tat gac atg gag aac gta ctg ctt ggt ctc 1077			
Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu			
310	315	320	
ttt tca aca atc cat gat tct atc cag tat gtc cag aag aat gca gga 1125			
Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly			
325	330	335	
aag ctg acc acc act att ggc aag tta tgt gcc cat tct caa caa cgc 1173			
Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg			
340	345	350	355

caa tat aga tct gct tat tat cct gaa gat ctc ttt att gac aag aaa	1221
Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys	
360 365 370	
gta tta aaa gtt gct cat gta gaa cat gaa gaa acc tta tcc agc cga	1269
Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg	
375 380 385	
aga agg gaa cta att cag aag ttg aag tct ttc atc agc ttc tat agt	1317
Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser	
390 395 400	
gct ttg cct ggc tac atc tgc agc cat agc cct gtg gcg gaa aac gac	1365
Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp	
405 410 415	
acc ctt tgc tgg aat gga caa gaa ctc gtg gag aga tac agc caa aag	1413
Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys	
420 425 430 435	
gca gca agg aat gga atg aaa aac cag ttc aat ctc cat gag ctg aaa	1461
Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys	
440 445 450	
atg aag ggc cct gag cca gtg gtc agt caa att att gac aaa ctg aag	1509
Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys	
455 460 465	

cac att aac cag ctc ctg aga acc atg tct atg ccc aaa ggt aga gtt 1557
 His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val
 470 475 480

ctg gat aaa aac ctg gat gag gaa ggg ttt gaa agt gga gac tgc ggt 1605
 Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly
 485 490 495

gat gat gaa gat gag tgc att gga ggc tct ggt gat gga atg ata aaa 1653
 Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys
 500 505 510 515

gtg aag aat cag ctc cgc ttc ctt gca gaa ctg gcc tat gat ctg gat 1701
 Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp
 520 525 530

gtg gat gat gcg cct gga aac agt cag cag gca act ccg aag gac aac 1749
 Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn
 535 540 545

gag ata agc acc ttt cac aac ctc ggg aac gtt cat tcc ccg ctg aag 1797
 Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys
 550 555 560

ctt ctc acc agc atg gcc atc tcg gtg gtg tgc ttc ttc ttc ctg gtg 1845
 Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe Phe Leu Val
 565 570 575

cac tga ctgcctggtg cccagcacat gtgctgccct acagcaccct gtggtcttcc 1901

His

580

tcgataaagg gaaccacttt cttatTTTTT tctatTTTTT tttttttggt atcctgtata 1961
 cctcctccag ccatgaagta gaggactaac catgtgttat gttttcgaaa atcaaattggt 2021
 atctttttgga ggaagataca ttttagtggt agcatataga ttgtcctttt gcaaagaaag 2081
 aaaaaaaacc atcaagtigt gccaaattat tctcctatgt ttggctgcta gaacatggtt 2141
 accatgtctt tctctctcac tccctccctt tctatcgttc tctctttgca tggatttctt 2201
 tgaaaaaaaa taaattgctc aaataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2261
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2300

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Ala	Cys	Leu	Val	Val	Ala	Met	Leu	Leu
1				5				10					15		
Ser	Leu	Asp	Phe	Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp
				20				25					30		
Ala	Thr	Cys	His	Gln	Val	Arg	Ser	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Gln	Pro	Gly

35	40	45
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val		
50	55	60
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys		
65	70	75
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala		
85	90	95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln		
100	105	110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala		
115	120	125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe		
130	135	140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp		
145	150	155
Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro		
165	170	175
Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu		
180	185	190
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe		
195	200	205
Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln		
210	215	220
Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile		
225	230	235
Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu		
245	250	255
Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys		
260	265	270

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285
 Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 340 345 350
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 355 360 365
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 370 375 380
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 385 390 395 400
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 405 410 415
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495
 Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly

500 505 510
 Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 515 520 525
 Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 530 535 540
 Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
 545 550 555 560
 Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
 565 570 575
 Phe Leu Val His
 580

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

atagaattcc accatggccg ggaccgtgcg c

31

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ataggatccc ttcagcgggg aatgaacgtt c

31

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

gggccagtgg atagacagat g

21

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

gctcactgga tggtaggaag atg

23

<210> 9

<211> 1392

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1389)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M3C11 H chain)

<400> 9

atg aac ttc ggg ctc acc ttg att ttc ctt gtc ctt act tta aaa ggt 48
Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag 96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

cct gga gga tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

agt cgc tat gcc atg tct tgg gtt cgc cag att cca gag aag ata ctg 192
 Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Ile Leu
 50 55 60

gag tgg gtc gca gcc att gat agt agt ggt ggt gac acc tac tat tta 240
 Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80

gac act gtg aag gac cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aat aat 288
 Asp Thr Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn
 85 90 95

acc ctg cac ctg caa atg cgc agt ctg agg tct gag gac aca gcc ttg 336
 Thr Leu His Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110

tat tac tgt gta aga cag ggg ggg gct tac tgg ggc caa ggg act ctg 384
 Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125

gtc act gtc tct gca gct agc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg 432
 Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140

gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc 480
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160

ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca 528
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175

ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc 576
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190

tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc 624
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205

ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac 672
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220

acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac 720
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc 768
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 816
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 864

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 912
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 960
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 1008
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 1056
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1104
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1152
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1200
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

17/63

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Ile Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn
85 90 95

Thr Leu His Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

165 170 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 11

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1410)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M1E07 H chain)

<400> 11

atg gga tgg aac tgg atc ttt att tta atc ctg tca gta act aca ggt 48
Met Gly Trp Asn Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

gtc cac tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

act ggc tac tac atg cac tgg gtg aag caa agt cct gaa aag agc ctt 192
Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu
50 55 60

gag tgg att gga gag att aat cct agc act ggt ggt act acc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
 65 70 75 80

cag aag ttc aag gcc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

aca gcc tac atg cag ctc aag agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

tat tac tgt gca agg agg ggc gga tta act ggg acg agc ttc ttt gct 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Leu Thr Gly Thr Ser Phe Phe Ala
 115 120 125

tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gct agc acc aag 432
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg 480
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg 528
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc 576
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg 624
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac 672
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc 720
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa 768
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac 816
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac 864
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc 912

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac 960

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg 1008

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca 1056

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa 1104

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac 1152

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1200

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1248

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

405

410

415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1296

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

420

425

430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1344

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

435

440

445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1392

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450

455

460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga

1413

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 12

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M1E07 H chain)

<400> 12

Met Gly Trp Asn Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly

1

5

10

15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Leu Thr Gly Thr Ser Phe Phe Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

165	170	175
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
195	200	205
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
210	215	220
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
225	230	235
240		
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
245	250	255
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
260	265	270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
275	280	285
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
290	295	300
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
305	310	315
320		

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 13

<211> 1416

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1413)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M19B11 H chain)

<400> 13

atg aac ttc ggg ctc acc ttg att ttc ctc gtc ctt act tta aaa ggt 48
Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

cct gga ggg acc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga tcc act ttc 144
Pro Gly Gly Thr Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe
35 40 45

agt aac tat gcc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gag aag agg ctg 192
 Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

gag tgg gtc gca gcc att gat agt aat gga ggt acc acc tac tat cca 240
 Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

gac act atg aag gac cga ttc acc att tcc aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Thr Met Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

acc ctg tac ctg caa atg aac agt ctg agg tct gaa gac aca gcc ttt 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
 100 105 110

tat cac tgt aca aga cat aat gga ggg tat gaa aac tac ggc tgg ttt 384
 Tyr His Cys Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe
 115 120 125

gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gct agc acc 432
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
 130 135 140

aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct 480
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa 528

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac 576
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc 624
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc 672
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag 720
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct 768
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag 816
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg 864
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

275	280	285	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac			912
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
290	295	300	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac			960
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
305	310	315	320
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac			1008
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
325	330	335	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc			1056
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
340	345	350	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga			1104
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
355	360	365	
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag			1152
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
370	375	380	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac			1200
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
385	390	395	400

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1248
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

405

410

415

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1296
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

420

425

430

aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca 1344
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

435

440

445

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc 1392
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

450

455

460

ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1416
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 14

<211> 471

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
 chimeric antibody (M19B11 H chain)

<400> 14

Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Thr Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Thr Met Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
100 105 110

Tyr His Cys Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser

145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 15

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1410)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M18D04 H chain)

<400> 15

atg gaa tct aac tgg ata ctt cct ttt att ctg tcg gta gct tca ggg 48

Met Glu Ser Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ala Ser Gly

1

5

10

15

gtc tac tca gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg 96

Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg

20

25

30

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

act ggc tac tgg atg cgc tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg 192
Thr Gly Tyr Trp Met Arg Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

gaa tgg att ggc gct att tat cct gga aat agt gat aca aca tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn
65 70 75 80

cag aag ttc aag ggc aag gcc aaa ctg act gca gtc aca tct gtc agc 288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Val Ser
85 90 95

act gcc tac atg gaa ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc 336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

tat tac tgt tca aga tcg ggg gac cta act ggg ggg ttt gct tac tgg 384
Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca gcc aaa gct agc acc aag 432
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr Ala Lys Ala Ser Thr Lys
130 135 140

ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg 480
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac 864
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc 912
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac 960
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg 1008
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca 1056
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa 1104
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac 1152
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc 1200
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 1248
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag 1296
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc 1344
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc 1392
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1413
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 16

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M18D04 H chain)

<400> 16

Met Glu Ser Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ala Ser Gly
1 5 10 15

Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Trp Met Arg Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Val Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr Ala Lys Ala Ser Thr Lys

130

135

140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

145

150

155

160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

165

170

175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

180

185

190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

195

200

205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

210

215

220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

225

230

235

240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

245

250

255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

260

265

270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

275

280

285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 17

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (714)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
 chimeric antibody (M3C11 L chain)

<400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa 48
 Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
 1 5 10 15

acc aac ggt gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt 96
 Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val

20	25	30	
acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc			144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu			
35	40	45	
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca			192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro			
50	55	60	
ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ttg gac tct			240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser			
65	70	75	80
gga gcc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca			288
Gly Ala Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr			
85	90	95	
ctg aaa atc agt aga gtg gag gct gag gat ttg gga att tat tat tgc			336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys			
100	105	110	
tgg caa ggt aca cat ttt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg			384
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu			
115	120	125	
gag ctg aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca			432
Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
130	135	140	

tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg 480
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac 528
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc 576
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca 624
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc 672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga 717
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 18

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M3C11 L chain)

<400> 18

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1 5 10 15

Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
20 25 30

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
65 70 75 80

Gly Ala Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
100 105 110

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 19

<211> 717

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

51/63

195 200 205

gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc 672
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210 215 220

ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga 717
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 20

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M1E07 L chain)

<400> 20

Met Ser Pro Val Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln Glu
1 5 10 15

Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro

50

55

60

Gly Gln Ala Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
65 70 75 80

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Leu Gln Ser Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 21

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (702)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
 chimeric antibody (M19B11 L chain)

<400> 21

atg aga ccc tcc att cag ttc ctg ggg ctc ttg ttg ttc tgg ctt cat 48
 Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15

ggc gtt cag tgt gac atc cag atg aca cag tct cca tcc tca ctg tct 96
 Gly Val Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

gca tct ctg gga ggc aaa gtc acc atc act tgc aag gca agt cag gac 144
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

35

40

45

att aac aag aat ata gtt tgg tac caa cac aag cct gga aaa ggt cct 192
 Ile Asn Lys Asn Ile Val Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro

50

55

60

agg ctg ctc ata tgg tac aca tct aca tta cag cca ggc atc cca tca 240
 Arg Leu Leu Ile Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser

65

70

75

80

agg ttc agt gga agt ggg tct ggg aga gat tat tcc ttc agc atc agc 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser

85

90

95

aac ctg gag cct gaa gat att gca act tat tac tgt cta cag tat gat 336
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

100

105

110

aat ctt cca cgg acg ttc ggt gga ggc acc aaa ctg gaa atc aaa cgt 384
 Asn Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115

120

125

acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 432
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130

135

140

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 480
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg 528
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

ggc aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 576
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 624
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 672
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga 705
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 22

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M19B11 L chain)

<400> 22

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Val Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Asn Ile Val Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130

135

140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145

150

155

160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165

170

175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180

185

190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195

200

205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210

215

220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

<210> 23

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (717)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M18D04 L chain)

<400> 23

atg agg ttc tct gct cag ctt ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct 48
Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

gga tcc act gca gat att gtg atg acg cag gct gca ttc tcc aat cca 96
Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
20 25 30

gtc act ctt gga aca tca act tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt 144
Val Thr Leu Gly Thr Ser Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

ctc cta cat agt aat ggc atc act tat ttg tat tgg tat ctg cag aag 192
Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

cca ggc cag tct cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc 240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

tca gga gtc cca gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc 288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85

90

95

aca ctg aga atc agc aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac 336

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100

105

110

tgt gct caa aat cta gaa ctt ccg tat acg ttc gga tcg ggg acc aag 384

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

115

120

125

ctg gaa ata aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg 432

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

130

135

140

cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg 480

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

145

150

155

160

ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat 528

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

165

170

175

aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac 576

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp

180

185

190

agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa 624

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys

195

200

205

gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag 672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

ggc ctg agc tgc ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tga 720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 24

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Mouse-human
chimeric antibody (M18D04 L chain)

<400> 24

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro
20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210

215

220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/06, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAPPURO M.I. et al., 'Overexpression of glypican-3 in human hepatocellular carcinomas determined by immunohistochemistry using a monoclonal antibody', Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, March 2002, Vol.43, page 219	1-13
P,X	WO 03/000883 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroyuki ABURAYA), 03 January, 2003 (03.01.03), (Family: none)	1-16
P,X	WO 03/010336 A2 (DEBUSCHEWITZ S., JOBST J., KAISER S.), 06 February, 2003 (06.02.03), Page 21, Accession Nr.L47, 125.1 (Family: none)	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October, 2003 (23.10.03)

Date of mailing of the international search report

04 November, 2003 (04.11.03)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11318

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17, 18

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 17 and 18 involve methods for treatment of the human body by therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12N15/06, C07K16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	CAPPURO M. I. et al., 'Overexpression of glypican-3 in human hepatocellular carcinomas determined by immunohistochemistry using a monoclonal antibody' Proceeding of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, March 2002, vol. 43, p. 219	1-13
PX	WO 03/000883 A1 (中外製薬株式会社、油谷浩幸) 2003. 01. 03 (ファミリーなし)	1-16
PX	WO 03/010336 A2	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 10. 03

国際調査報告の発送日

04.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植原 克典



4B

9840

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	(DEBUSCHEWITZ S., JOBST J., KAISER S.) p. 21、Accession Nr. L47 125.1参照、2003.02.06 (ファミリーなし)	
P X	MIDORIKAWA Y. et al., 'Glypican-3, overexpressed in hepato- cellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling' International Journal of Cancer, 10 February 2003, Vol. 103, No. 4, p. 455-465	1-13
P X	SUNG Y. K. et al., 'Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma' Cancer Science, March 2003, Vol. 94, No. 3, p. 259-262	1-13
P X	CAPURRO M. et al., 'Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma' GASTROENTEROLOGY, July 2003, 125(1), 89-97	1-13
A	LAGE H. et al., 'Cloning and characterization of human cDNAs encoding a protein with high homology to rat intestinal deve- lopment protein OCI-5' Gene 188(1997), 151-156	1-16

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17、18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

上記請求の範囲に記載された発明は、人の治療・診断方法を包含するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。